

Estudio de los precursores hemato-vasculares durante el desarrollo embrionario de ratón

TESIS DOCTORAL

ANA E. CAÑETE SÁNCHEZ
2012





UNIVERSIDAD PABLO DE OLAVIDE
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA, ANATOMÍA Y
BIOLOGÍA CELULAR

Estudio de los precursores hemato-vasculares durante
el desarrollo embrionario de ratón

TESIS DOCTORAL

Ana E. Cañete Sánchez, 2012

La Dra. María José Sánchez Sanz, Científico Titular del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (C.S.I.C.), Investigador Principal y jefe del grupo de investigación Hematopoyesis y Células Madre en el Centro Andaluz de Biología del Desarrollo (CABD) de la Universidad Pablo de Olavide en Sevilla, como directora de la Tesis Doctoral; y el Dr. José Antonio Sánchez Alcázar, Profesor titular del Área de Biología Celular de la Universidad Pablo de Olavide, como tutor de la Tesis Doctoral.

CERTIFICAN:

Que el trabajo presentado por la licenciada Ana E. Cañete Sánchez titulado “Estudio de los precursores hemato-vasculares durante el desarrollo embrionario de ratón” ha sido realizado por ella bajo su dirección y supervisión en el CABD, y reúne, a su juicio, las condiciones de originalidad y calidad científica necesarias para constituir una Tesis Doctoral y optar al grado de Doctor por la Universidad Pablo de Olavide de Sevilla.

Y para que así conste, expiden el presente certificado.

Directora:

Tutor:

María José Sánchez Sanz

José Antonio Sánchez Alcázar

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría aprovechar estas líneas para dar las gracias a todos aquellos que de una u otra manera han hecho posible la realización de esta Tesis Doctoral.

En primer lugar me gustaría agradecer la inestimable labor de mi directora, M^a José Sánchez Sanz, ya que sin su apoyo este trabajo no habría sido posible. Gracias por brindarme esta oportunidad, confiar en mí desde el primer momento y aportarme valiosos conocimientos y enseñanzas, así como por las sugerencias y correcciones en todo el proceso de elaboración de la Tesis. Muchas gracias.

Agradecer a todos los miembros del laboratorio: Cristina y Esther, quienes me enseñaron las técnicas básicas del laboratorio y se convirtieron en dos grandes amigas; Miguel, por darme el revelo de su proyecto; Isa, imprescindible en el laboratorio y animalario; Ana y sus maravillosas secciones; mis becarias (Soraya, Alba y Dilara) quienes participaron activamente en la realización de este trabajo; Curro y Valentine, involucrados en el seguimiento de esta investigación. Así como el personal del animalario, Ana, Candy y Antonio, de los cuales dependemos en todo momento.

A Kathy, excelente profesional y amiga, gracias por la incalculable ayuda con los experimentos de citometría de flujo y confocal, así como el apoyo que has sido para mí en todo momento.

Gracias a aquellos que me abrieron las puertas de su laboratorio y de forma incondicional me enseñaron y me ayudaron en técnicas necesarias para avanzar en mi estudio. Entre ellos, el Dr. Manuel Dolado y su estudiante Marina Piquer en el Cabimer (Sevilla); y la Dra. Elaine Dzierzak y sus post doctorales Michaela Crisan y Tomomasa Yokomizo en el Instituto *Erasmus MC Stem Cell, Erasmus Medical Center*, en Rotterdam.

A cada uno de los miembros del laboratorio de James Castelli y Joaquim Culi, a las niñas del master (Elena, Sofía, Helena y Mariam) y al grupo de genética, por ayudarme en todo lo que he necesitado y compartir conmigo el día a día y muchos momentos inolvidables. Especialmente tengo que nombrar a mi mejor amigo, Mario, por estar siempre ahí.

Muchas gracias también al resto del personal del CABD con los que he tenido la suerte de compartir estos años.

A mi familia y a mis amigos, por ser mis puntos de apoyo, sin quienes yo, no sería quien soy. Especialmente a Álvaro, por aparecer en mi vida y hacerla aún más feliz, y a mis Padres, mis hermanos y mi abuela, para quienes sólo tengo palabras de agradecimiento por su ayuda e infinito cariño y estar conmigo en todo momento. Porque todo lo que soy y todo lo que pueda llegar a ser os lo debo a vosotros. Sois los mejores y os quiero.

GRACIAS A TODOS

Financiación del Grupo

La investigación en el grupo de M^a José Sánchez Sanz está parcialmente financiada por el MICINN (BFU2010-15801), por la Junta de Andalucía (REF. PAI Bio295 y SGUI/08012007) y CONSOLIDER CSD-2007-00008. Toda la financiación española está cofinanciada por el programa de la unión europea FEDER.

Durante la realización de este proyecto he disfrutado de una Beca del Plan Propio de la Universidad Pablo de Olavide modalidad 2B. Beca para realizar la tesis doctoral asociada a grupos de investigación de la UPO (2008-2012).

A mis padres

A mis hermanos

A mi abuela

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
INTRODUCCIÓN	7
1. PREÁMBULO	9
2. PROGENITORES HEMATO-VASCULARES EN EL ADULTO	9
2.1 Definición de progenitor endotelial	9
2.2 Potencial vascular de las células hematopoyéticas adultas	10
2.2.1 Potencial vascular de células madre hematopoyéticas	10
2.2.2 Potencial vascular de las células mieloides	11
2.2.3 Otras células con potencial vascular	12
2.3 Progenitores vasculares in vitro	13
3. RELACIÓN ONTOGÉNICA ENTRE EL SISTEMA HEMATOPOYÉTICO Y EL VASCULAR	16
3.1 Desarrollo del sistema hematopoyético	16
3.1.1 Adulto	16
3.1.2 Desarrollo temprano	16
3.1.3 La región AGM	19
3.1.4 El hígado fetal. Células madre fetales difieren de las adultas	22
3.2 Desarrollo del sistema vascular	24
3.2.1 Origen	25
3.2.2 Formación de los plexus vasculares	25
3.2.3 Angiogénesis	26
3.2.4 Estructura de la vasculatura de algunos órganos en el adulto	27
3.3 El hemangioblasto y el endotelio hemogénico	28
3.3.1 El hemangioblasto	28
3.3.2 Endotelio hemogénico	30
4. EL GEN SCL, FUNCIÓN EN EL SISTEMA HEMATO-VASCULAR Y VECTORES DE EXPRESIÓN	32
4.1 El vector de expresión SCL3'Enh-PLAP	32
JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	35
MATERIALES Y MÉTODOS	39

RATONES TRANSGÉNICOS.....	41
Ratones transgénicos para la construcción SV40/PLAP/19 (SCL3'Enh-PLAP)	41
Ratones transgénicos para la construcción 6E5/LacZ/3'Enhancer (SCL3'Enh-LacZ)	41
Ratones transgénicos DsRed, variante T3	42
DISECCIÓN Y HOMOGENIZACIÓN DE ORGANOS HEMATOPOYÉTICOS.....	42
TINCIÓN NBT PARA EMBRIONES SCL3'Enh-PLAP	43
ANÁLISIS Y SEPARACIÓN CELULAR POR CITOMETRÍA DE FLUJO.....	44
TRASPLANTES	47
Trasplante en ratones adultos irradiados.....	47
Trasplante en ratones recién nacidos tratados con busulfán	47
ANÁLISIS DE INJERTO HEMATOPOYÉTICO	49
A corto plazo (al mes del trasplante):.....	49
Sangrado de animales	49
Extracción de ADN con fenol cloroformo.....	49
PCR para PLAP, LacZ, RFP y Myo.....	50
A largo plazo (a los 5 meses del trasplante):	51
Análisis de sangre por citometría de flujo: lisis de eritrocitos	51
PCR semicuantitativa	52
ANÁLISIS DE INJERTO VASCULAR	53
Procesado de los órganos y generación de secciones histológicas	53
Tinción NBT en secciones	53
Cuantificación señal dispersa NBT positiva por fraccionamiento de colores “threshold method”	54
Cuantificación del número y área relativa de parches PLAP+ por acotamiento zonal... ..	56
Inmuno-fluorescencia en secciones	58
ANÁLISIS DE RIÑÓN ADULTO	61
Homogenización de riñón.....	61
Ensayo de formación de colonias para progenitores hematopoyéticos	61
HIBRIDACIÓN IN SITU PARA DETECTAR EL CROMOSOMA Y (Y-FISH)	62
TINCIÓN DAB INMUNO HISTOQUÍMICA	64
ANÁLISIS DE RATONES DsRed: Criopreservación de tejidos y crio secciones.....	65
CULTIVO DE ÓRGANOS DE TEJIDOS EMBRIONARIOS	66
ENSAYO DE FORMACIÓN DE REDES O TÚBULOS ENDOTELIALES. CO-CULTIVOS CON LA LÍNEA CELULAR OP-9	67

Células OP9	67
Descongelación de células OP9	67
Mantenimiento.....	67
Congelación	68
Células fetales procedentes del AGM e hígado	68
Co-cultivo	68
Tinción con CD31 de células co-cultivadas con OP9 para identificar el desarrollo endotelial	69
TINCIÓN INMUNO- FLUORESCENTE DE EMBRIONES.....	69
RESULTADOS	73
1. POTENCIAL HEMATO-VASCULAR DE CÉLULAS FETALES VS ADULTAS EN TRASPLANTES	75
1.1 Patrón de expresión del vector SCL3'Enh-PLAP en vasculatura de ratones transgénicos adultos.....	75
1.2 Determinación de la repoblación hematopoyética de células de hígado fetal y médula ósea adulta en trasplantes en recién nacidos y adultos irradiados.....	78
1.3 Determinación de la repoblación vascular del hígado.	80
1.3.1 Cuantificación de señal dispersa NBT positiva por fraccionamiento de colores "threshold method"	82
1.3.2 Cuantificación del número y área relativa de parches NBT+ por acotamiento zonal	85
1.4 Determinación de la repoblación vascular del riñón y corazón.	86
1.4.1 Naturaleza de las células que forman los parches en riñón y corazón.	89
1.4.2 Caracterización fenotípica de las células PLAP+CD45-IsoB4- en el riñón de quimeras de hígado fetal.....	91
1.4.3 Caracterización funcional hematopoyética de células PLAP+ de riñón.	93
1.5 Determinación de la capacidad de repoblación de hepatocitos de células de hígado fetal trasplantadas en recién nacidos.....	97
1.5.1 Determinación de repoblación de parénquima hepático en trasplantes de células fetales mediante determinación de marcadores cromosómicos Y/X por Hibridación in situ.....	98
1.5.2 Determinación de repoblación de parénquima hepático en trasplantes de células fetales derivadas de donantes transgénicos para el vector de expresión ubicua actina-Dsred.....	100

2. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y FUNCIONAL DE LOS PRECURSORES HEMATO-VASCULARES EN EL HÍGADO FETAL.....	105
2.1. Caracterización fenotípica de las células de hígado fetal de día 12 por citometría de flujo.	105
2.2Potencial de diferenciación hemato-vascular en trasplantes de diferentes poblaciones celulares	108
2.2.2 Las células SCL3'EnhPLAP+VE-Cad+ contienen actividad vascular y hematopoyética trasplantable	111
2.2.3 Las células SCL3'EnhPLAP+CD45+ no generan parches vasculares.....	113
2.2.3.1 La incubación con anticuerpo anti-CD45 no afecta la formación de parches vasculares.....	114
2.2.3.2 Las células PLAP+CD45- originan parches vasculares y no contribuyen a los espacios portales.....	114
2.3 Potencial de diferenciación vascular en otros órganos: riñón y corazón.....	120
3. ANÁLISIS DE LA DISTRIBUCIÓN ESPACIO-TEMPORAL DE PROGENITORES HEMATO-VASCULARES DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO DE RATÓN.	123
3.1 Determinación de poblaciones PLAP+VE-Cad+CD45- y PLAP+VE-Cad+CD45+ en diferentes localizaciones hematopoyética en embriones de día 12.	123
3.2 Caracterización del potencial de repoblación hemato-vascular en trasplantes de células procedentes de diferentes localizaciones hematopoyética en embriones de día 12.	125
3.3 Caracterización del potencial de repoblación hemato-vascular: mapeo espacio/temporal durante el desarrollo del hígado y del AGM.	129
3.3.1 En el hígado	129
3.3.2 En el AGM	135
3.3.2.1 Potencial de diferenciación vascular en otros órganos: riñón y corazón	136
3.4 Localización espacial de precursores hemato-vasculares PLAP+ en embriones de día 11	137
4. SISTEMAS DE CULTIVO PARA PROGENITORES TEPs	139
4.1 Explantes de hígado fetal para expansión/generación de actividad hemato-vascular	139
4.2 Ensayo de diferenciación endotelial: células formadoras de túbulos vasculares en co-cultivos con la línea celular OP9.	142

5. ASPECTOS SOBRE LA REPOBLACIÓN VASCULAR DE CÉLULAS DE HÍGADO FETAL TRASPLANTADAS EN RECIÉN NACIDOS.	147
5.1 Cinética de formación de parches vasculares.....	147
5.2 Condicionamiento del receptor con busulfán.	148
<i>DISCUSIÓN</i>	153
Progenitores fetales versus adultos.....	155
Progenitores hematopoyéticos versus progenitores endoteliales	158
Emergencia de progenitores endoteliales trasplantables durante la embriogénesis: relación con localizaciones hematopoyéticas, hemangioblastos, endotelio hemogénico, meso-angioblastos y angioblastos.	160
Dinámica de re-población vascular del hígado neonatal.	162
CONCLUSIONES	165
<i>BIBLIOGRAFÍA</i>.....	171
<i>APÉNDICE</i>.....	187
SOLUCIONES DE USO COMÚN.....	189
<i>ANEXO</i>.....	191

ABREVIATURAS

ABC: complejo avidina-biotina-peroxidasa (del inglés *Avidin-Biotin-Complex*)

ADN: ácido desoxirribonucleico

AGM: región del embrión que corresponde a la Aorta, Gónadas y Mesonéfrs

CMH: células madre hematopoyéticas (en inglés HSC, *Hematopoietic Stem Cells*)

CFU-C: Unidades Formadoras de Colonias en Cultivo, se trata de un tipo de progenitores mieloides formadores de colonias in vitro (del inglés *colony forming units- culture*),

CFU-S: Unidades Formadoras de Colonias de Bazo, se trata de progenitores inmaduros que pueden formar colonias de células mieloides en el bazo de animales irradiados después del trasplante (del inglés *Colony Forming Unit- Spleen*)

CPE: Células progenitoras endoteliales (en inglés EPC, *Endothelial Progenitor Cells*)

CPH: Célula progenitora hematopoyética (en inglés HPC, *Hematopoietic Progenitor Cells*)

DAB: 3,3'-diaminobencidina

DAPI: 4', 6-Diamidino-2-fenilindol diclorhidrato

DIG: digoxigenina

DPBS: solución salina tamponada con fosfato (del inglés Dulbecco's phosphate buffered saline)

E: Embrión

e.e. = embriones equivalentes

ECFCs: células formadoras de colonias endoteliales (del inglés *endothelial colony forming cells*)

EDTA: ácido etileno-diamino-tetra-acético (del inglés *Ethylene Diamine Tetracetic Acid*)

e- LPP- EPC: células progenitoras endoteliales en estadios tempranos de desarrollo con bajo potencial proliferativo (del inglés, *early- low proliferative potential- endothelial progenitor cells*)

Enh: secuencia reguladora o potenciador (del inglés *Enhancer*)

FACS: clasificador de células vivas por fluorescencia (del inglés *Fluorescence- activated cell sorter*)

FCS: suero fetal de ternera (del inglés *fetal calf serum*)

FDG: sustrato para detectar β -galactosidasa (del inglés *fluorescein di- β -D-galactopyranoside*)

FITC: isotiocianato de fluoresceína (del inglés *Fluorescein Isothiocyanate*)

FISH: Hibridación fluorescente in situ (del inglés *Fluorescence in situ hybridization*)

GFP: proteína verde fluorescente (del inglés *Green Fluorescent Protein*)

hPLAP: gen reportero que codifica la fosfatasa alcalina de la placenta humana (del inglés *human-Placental Alkaline Phosphatase*)

HPP-CFC: células formadoras de colonias con alto potencial proliferativo (del inglés *high proliferative potential- colony forming cell*)

IsoB4: Isolectina B4

Kb: kilobases

LacZ: gen reportero que codifica la enzima β -galactosidasa

I-HPP-EPC: células progenitoras endoteliales en estadios tardíos de desarrollo con alto potencial proliferativo (del inglés, *late high proliferative potential- endothelial progenitor cells*)

LPP-CFC: células formadoras de colonias maduras, con bajo potencial proliferativo (del inglés *low proliferative potential- colony forming cell*)

LTR-HSC: Células Madre Hematopoyéticas con capacidad de repoblar el sistema hematopoyético de un individuo adulto irradiado, una vez que son trasplantadas al torrente sanguíneo (del inglés *long-term reconstituting hematopoietic stem cells*)

MAPC: células progenitoras multipotentes activadas (del inglés *multipotent activated progenitor cells*)

ml: mililitros

MO-A: médula ósea adulta

NBT: Nitroblue tetrazolium, sustrato de la fosfatasa alcalina.

μ l: microlitros

nm: nanometros

pb: pares de bases

P/E: Penicilina/Estreptomicina

PI: Ioduro de Propidio (del inglés Propidium iodide)

PBS: solución salina tamponada con fosfato (del inglés *Phosphate Buffered Saline*)

PCR: reacción en cadena de la polimerasa (del inglés *Polymerase Chain Reaction*)

PE: Ficoeritrina (del inglés *Phycoerythrin*)

PK: Proteinasa Kinasa

Pm: peso molecular

rpm: revoluciones por minuto

SCL: (del inglés *Stem Cell Leukemia*)

SDS: Dodecil Sulfato Sódico (del inglés *Sodium Dodecyl Sulphate*)

SSC: tampón citrato sódico salino (del inglés *Sodium Chloride-Sodium Citrate*)

SV40: promotor de vectores de expresión (Simian virus 40).

TAE: tampón Tris-ácido acético-EDTA

TBE: tampón Tris-Borato-EDTA

TEPC: Células Progenitores Endoteliales trasplantables (del inglés, *Transplantable Endothelial Progenitor Cells*)

VE-Cad: VE-Cadherina

INTRODUCCIÓN

1. PREÁMBULO

Las células madre y progenitoras tienen un papel fundamental durante el desarrollo y la homeostasis de tejidos y órganos. Su identificación, caracterización y determinación de su capacidad de injerto en trasplantes, constituyen temas de alto impacto en investigación básica y biomédica. Teniendo en cuenta la relación ontogénica entre endotelio y células sanguíneas durante el desarrollo embrionario, este trabajo de investigación aborda la caracterización de precursores endoteliales obtenidos de localizaciones hematopoyéticas durante el desarrollo embrionario de ratón. Nuestro ensayo de referencia para determinar el potencial funcional de progenitores endoteliales consiste en determinar su capacidad de repoblación vascular endotelial postnatal a largo plazo en trasplantes. Es uno de los ensayos funcionales más exigentes, que posee la ventaja de tener una proyección directa en aplicaciones terapéuticas. Sin embargo, otros muchos trabajos han empleado distintas aproximaciones para definir la función de progenitores endoteliales. En esta introducción presentamos un resumen de los trabajos que han conducido a perfilar el concepto de progenitor endotelial y su conexión con las células sanguíneas en el adulto y durante el desarrollo. Constituyen, por tanto, el contexto de discusión de nuestros resultados.

2. PROGENITORES HEMATO-VASCULARES EN EL ADULTO

2.1 Definición de progenitor endotelial

Los estadios de diferenciación celular desde una célula madre hasta una célula madura efectora se pueden dividir en tres fases: estadio de células madre, con capacidad de diferenciación multipotencial y de producir más células madre; estadio de progenitor, con capacidad de diferenciación a más de un linaje y limitada capacidad de proliferación; y estadio precursor, célula inmadura con capacidad de madurar a una célula efectora. En el campo de los progenitores endoteliales, está generalmente aceptado que una célula progenitor endotelial (CPE) (del inglés *EPC, endotelial progenitor cell*) es una célula no endotelial que puede originar células endoteliales *in vitro* y/o *in vivo* e incorporarse a la vasculatura postnatal (Rafii and Lyden 2003). Hay diversos tipos de progenitores endoteliales dependiendo del origen, características fenotípicas (Tabla 1) y si las funciones se definen *in vitro* o *in vivo*. En general, estos progenitores tienen un limitado potencial de diferenciación vascular una vez trasplantados en condiciones no isquémicas. Nuestra

definición de partida difiere de ésta y se inspira en las características funcionales en trasplantes que determinan la presencia de las células madre hematopoyéticas en una población: repoblación extensa y estable del donante.

2.2 Potencial vascular de las células hematopoyéticas adultas

Los sistemas hematopoyético y vascular se desarrollan en paralelo durante la embriogénesis y sus células comparte marcadores y redes genéticas que modulan su formación de forma coordinada. En base a estos aspectos comunes se hipotetizó la existencia en el adulto de progenitores endoteliales descendientes del linaje hematopoyéticos.

2.2.1 Potencial vascular de células madre hematopoyéticas

Las células madre y progenitores hematopoyéticos (del inglés *HSCs*, *hematopoietic stem cells*; y *HPC*, *hematopoietic progenitor cells*) del adulto generan todos los linajes sanguíneos, propiedad que mantienen cuando son trasplantados y que se lleva empleando en tratamientos de remplazo celular en enfermedades hematológicas desde hace más de cuarenta años. El trabajo pionero del grupo de Asahara y colaboradores, propuso la idea de que angioblastos y células progenitoras hematopoyéticas del adulto procedían de un progenitor común en base a la expresión de antígenos similares como Tie-2, Flk-1 y CD34 (Asahara, Murohara et al. 1997). En principio, aislaron células CD34+ de la circulación y demostraron que cultivadas con fibrinógeno/colágeno adquirirían forma elongada y expresaban marcadores endoteliales como el CD31, E-selectina, Tie-1 y acumulaban AcLDL. Además, en trasplantes, estas células podían incorporarse en sitios de vasculogénesis activa. Posteriormente, este grupo demostró, empleando ratones transgénicos para un vector de expresión de seguimiento de linaje endotelial Tie-2 LacZ, que podía enriquecer para progenitores endoteliales en la medula ósea (Takahashi, Kalka et al. 1999). Se abrían así nuevas y prometedoras perspectivas del uso de progenitores hematopoyéticos en terapias de remplazo celular de vasos dañados y regeneración vascular (Rafii and Lyden 2003).

Sin embargo, la eficiencia en contribución vascular era muy limitada. Por ello diversos grupos se embarcaron en el estudio de la actividad vascular de diferentes poblaciones incluidas en la población CD34+, entre otras, las células madre hematopoyéticas (CMHs) (Grant, May et al. 2002; Bailey, Jiang et al. 2004; Bailey, Willenbring et al. 2006). No obstante, incluso en estas circunstancias la diferenciación a endotelio vascular seguía siendo

muy limitado, solo observable cuando se infligía un daño vascular o se trataba con factores pro-angiogénicos como el VEGF (Lyden, Hattori et al. 2001; Garcia-Barros, Paris et al. 2003; Larrivee, Niessen et al. 2005). Es más, algunos estudios indicaban que CMHs obtenidas de ratones transgénicos para Flk1-LacZ o Tie1-LacZ y trasplantados a ratones adultos irradiados no contribuían a células endoteliales vasculares (Purhonen, Palm et al. 2008). Por lo tanto, a día de hoy no existe un consenso sobre el potencial endotelial de células madre hematopoyéticas obtenidas de medula ósea (Figura 1).

2.2.2 Potencial vascular de las células mieloides

Otra posibilidad planteada por diversos grupos proponía que las células endoteliales derivaban de una célula hematopoyética diferenciada como alternativa o en paralelo con la generación directa a partir de CMHs. Un candidato lo constituían las células mieloides (Figura 1).

A día de hoy la relación de las células mieloides con la neo-angiogénesis puede dividirse en tres niveles: a) progenitor endotelial; b) acción paracrina, mediante la producción de factores pro-angiogénicos; c) mediadores de la fusión de célula endoteliales “*tip*”.

Para investigar el potencial de diferenciación endotelial de poblaciones mieloides en trasplantes, el grupo de Bailey y colaboradores (Bailey, Willenbring et al. 2006), purificó progenitores mieloides y progenitores granulocíticos macrofágicos de medula ósea de transgénicos para Tie2-GFP. Una vez trasplantado determinó que, a corto plazo, estas células se incorporaban a la vasculatura como célula endoteliales (CD31+, factor von Willebrand+, Tie2+, CD45-, F4/80-, desmina- y α -actina del musculo liso-). Este proceso, como demuestran los autores, era un proceso de diferenciación/trans-diferenciación en el que no intervenía el mecanismos de la fusión celular descrito por otros grupos empleando el sistema Tie2-driven Cre/lox; Rosa-lacZ (Alvarez-Dolado, Pardal et al. 2003). El grado de incorporación sin embargo, seguía siendo muy bajo, entre 0.8 - 1.3% del endotelio analizado.

En relación con la función paracrina de las células mieloides, el trabajo pionero del grupo de Grunewald y colaboradores, demostró que la producción masiva de VEGF en un modelo de angiogénesis inducía el reclutamiento en los vasos de células mieloides pro-angiogénicas de medula ósea. Una minoría se incorporaba como células endoteliales, demostrando su función como progenitor endotelial, sin embargo, la gran mayoría era retenida en la zona perivascular como monocitos vasculares CD45+, VEGFR-1+ (Flt1+), VEGFR2 – (flk1-) y

CD11b+, productores de altos niveles de SDF, un factor mediador de la proliferación endotelial (Grunewald, Avraham et al. 2006). Así mismo otros grupos han demostrado la existencia de células mieloides con función pro-angiogénica específica en vascularización tumoral (De Palma, Venneri et al. 2005). Estas células mieloides expresan Tie2 e interesadamente, su transcriptoma es más similar a las células mieloides fetales que a las adultas, reflejando aspectos funcionales compartidos como sugieren los autores (Pucci, Venneri et al. 2009).

Otra de las función pro-vasculares de los macrófagos, recientemente descrita, consiste en promover la fusión de células endoteliales “tip” que van a la cabeza de la extensión tubular durante el crecimiento angiogénico, generando así mayor complejidad de los plexus vasculares durante la embriogénesis. Estas células mieloides expresan Tie2 y NRP1, proteínas de superficie que identifican a una subpoblación de células mieloides adultas importante en la angiogénesis tumoral (Fantin, Vieira et al. 2010).

Por tanto, la función de las células mieloides en neo-angiogénesis es diversa. Por el momento no está claro si hay múltiples mecanismos por los cuales una población mioide puede incorporarse a la vasculatura y diferenciarse a endotelio o existen diferentes subtipos de células mieloides dependiendo de su localización y fenotipo. En general se acepta que la capacidad de diferenciarse a endotelio in vivo es esporádica o incluso nula, pero sí ejercen un importante papel como promotores de la neo-angiogénesis (Chao and Hirschi 2010).

2.2.3 Otras células con potencial vascular

Células de médula ósea no hematopoyéticas también tienen la capacidad de generar células endoteliales en trasplantes. Así, las células mesenquimales de la médula ósea (progenitores de células de hueso, cartílago y tejido adiposo) se caracterizan por la expresión de marcadores como CD44 y ausencia de marcadores hematopoyéticos o vasculares. En cultivo, en presencia de VEGF, se ha conseguido que generen una población con características parecidas a las endoteliales (Oswald, Boxberger et al. 2004). Así mismo, otra población derivada del cultivo de médula ósea denominada MAPC (células progenitoras multipotentes activadas, del inglés *multipotent activated progenitor cells*), también presenta contribución a endotelio tumoral (Reyes, Dudek et al. 2002).

A parte de la circulación y de la médula ósea, también se han derivado precursores endoteliales de la pared de vasos sanguíneos (Figura 1). En humanos, estos precursores expresan CD34, CD31, VEGFR2 y Tie2 se han aislado de la aorta y del cordón umbilical

(Ingram, Caplice et al. 2005; Zengin, Chalajour et al. 2006). Aun no se ha determinado si estos progenitores existen en todos los vasos en zonas vasculogénicas específicas.

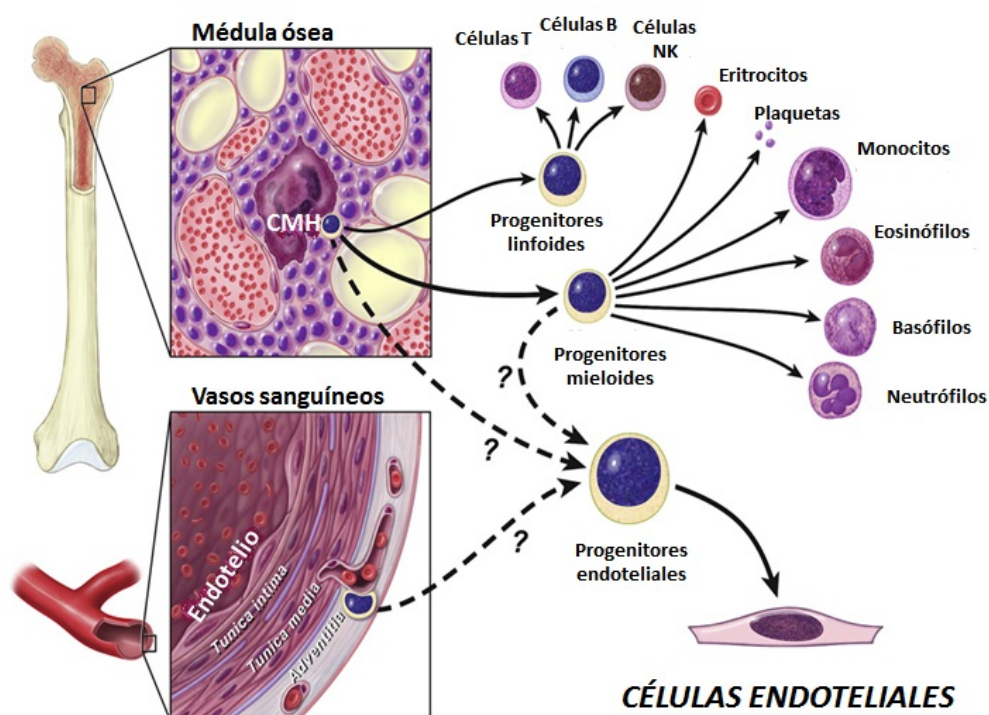


FIGURA 1. Células Progenitoras Endoteliales (CPE).

(En inglés EPCs, *Endothelial Progenitor Cells*) derivan de células madre hematopoyéticas (CMHs) de la médula ósea, de células hematopoyéticas diferenciadas a linaje mieloide o de la pared vascular. (Stitt, O'Neill et al. 2011). También células no hematopoyéticas de la médula ósea pueden contribuir a endotelio in vivo o in vitro (no mostrado).

2.3 Progenitores vasculares in vitro

Con la finalidad de establecer una jerarquía de linaje de diferenciación y expansión de progenitores endoteliales humanos, el grupo de Yoder e Ingram, inspirados en los sistemas de cultivo clonogénico para células madre hematopoyéticas (células formadoras de colonias con alto potencial proliferativo: HPP-CFC, del inglés *high proliferative potential- colony forming cell*; y progenitores maduros con bajo potencial proliferativo: LPP-CFC, del inglés *low proliferative potential- colony forming cell*), establecieron un sistema de cultivo para progenitores endoteliales derivados de la circulación (Ingram, Mead et al. 2004) y de la pared de los vasos (Ingram, Caplice et al. 2005; Critser and Yoder 2010).

El aislamiento mediante propagación de células en cultivos específicos ha permitido identificar dos tipos de poblaciones con propiedades angiogénicas diferentes: e-EPC (células progenitoras endoteliales tempranas con bajo potencial proliferativo, *early-LPP-EPC*),

consideradas como derivados hematopoyéticos por su perfil genético (Medina, O'Neill et al. 2010) y I-EPC (células progenitoras endoteliales tardías con alto potencial proliferativo, *late-HPP-EPC*) o ECFCs (células formadoras de colonias endoteliales, del inglés *endothelial colony forming cells*), con alto potencial proliferativo. Ambas con potencial de formación de vasos en matrigel (Yoder, Mead et al. 2007).

La incorporación de estas células a vasos maduros cuando se inyectan en el torrente sanguíneo es muy baja (Ziegelhoeffer, Fernandez et al. 2004; Purhonen, Palm et al. 2008; Sieveking and Ng 2009), sin embargo, se incorporan cuando son inyectadas directamente en tejidos dañados como el corazón infartado (Schuh, Liehn et al. 2008), extremidades isquémicas (Sasaki, Heeschen et al. 2006), o crecimiento tumoral (Nolan, Ciarrocchi et al. 2007) y se han acreditado como células con cierto valor terapéutico (Kim, Kim et al. 2009). La acción sobre la neo-angiogénesis depende del tipo de célula progenitora endotelial, si es de tipo e-EPC (hematopoyética) produce factores como IL-8, HGF, G-CSF, es decir una función paracrina. La I-EPC o ECFC, sin embargo pueden formar vasos (Reinisch, Hofmann et al. 2009).

En trabajos posteriores se ha determinado que el potencial vascular disminuye con el tiempo en cultivo y que los macrófagos /pericitos del receptor son importantes para la formación de vasos en la matrices de colageno-fibrinogeno y matrigel (Melero-Martin, De Obaldia et al. 2008).

TABLA 1. Caracterización fenotípica de progenitores endoteliales en ratón

Símbolo	Célula endotelial	Célula progenitora endotelial	Célula hematopoyética
CD31	+	+	Plaquetas, monocitos, células NK, neutrófilos, subpoblaciones células T
CD144 (VE-Cad)	+	+	+
vWF	+	+	Plaquetas
Flk-1	+	+	Progenitores
Tie-2	+	+	Progenitores
CD146	+	+	Subpoblaciones de células T activadas
Ingesta AcLDL	+	+	Células mieloides
CD14	+	-	Monocitos, macrófagos neutrófilos
CD133	-	+	Subpoblaciones de células madre
CD34	+	+	Subpoblaciones de células madre
CD45	-	+/-	+
Sca-1	-	+	Células madre/ progenitores
Ckit	-	+	Células madre/ progenitores
Isolectina B4	+	+	Células mieloides

3. RELACIÓN ONTOGÉNICA ENTRE EL SISTEMA HEMATOPOYÉTICO Y EL VASCULAR

Durante el desarrollo embrionario temprano, la formación de la sangre y vasos sanguíneos están íntimamente ligados. Estudios morfológicos (Sabin, 1920), genéticos (Shalaby, Rossant et al. 1995; Stainier, Weinstein et al. 1995) y con cultivos de células madre embrionarias (Kennedy, Firpo et al. 1997), apoyan un origen común para la sangre y el endotelio vascular. Esta asociación es remarcable en dos localizaciones embrionarias: en las "islas sanguíneas" del saco vitelino a día 7 de desarrollo (estadío E7) y en la aorta dorsal a partir del día 9 de desarrollo (E9).

En este apartado revisaremos los conceptos básicos sobre el desarrollo del sistema hematopoyético y el vascular.

3.1 Desarrollo del sistema hematopoyético

3.1.1 Adulto

El sistema hematopoyético en mamíferos está formado por diferentes tipos de células maduras efectoras (eritrocitos, linfocitos, células mieloides y magacariocitos) (Figura 1) que se encuentran en la circulación y órganos asociados al sistema hematopoyético (bazo, nódulos linfáticos, timo y médula ósea). Tienen un papel fundamental en la distribución de oxígeno, mantenimiento de la inmunidad y proceso de coagulación. Las células maduras tienen un periodo de vida limitado y continuamente se producen nuevas a partir de células madre hematopoyéticas, localizadas principalmente en la médula ósea de todos los huesos (Figura 1). El proceso de formación de las células hematopoyéticas a partir de progenitores se denomina HEMATOPOYESIS.

3.1.2 Desarrollo temprano

El sistema hematopoyético durante la vida embrionaria difiere notablemente del adulto, variando tanto la composición de los tipos de células sanguíneas como su localización a lo largo del desarrollo. En general, se considera que, las localizaciones donde emergen células sanguíneas en el embrión temprano son, secuencialmente en el tiempo, el saco vitelino (a

día 6-7 de desarrollo embrionario, E6-E7), la zona asociada a la aorta central, el AGM (*aorta-gonads-mesonephros*) (E8-9) y el hígado fetal (E10). Posteriormente otros vasos como las arterias umbilicales y vitelinas así como la placenta también presentan actividad hematopoyética. Sigue existiendo un amplio debate sobre cuales son las zonas generadoras de sangre y las zonas receptoras de células circulantes, tema complicado por el hecho de que a partir del día 8 de desarrollo el corazón empieza a bombear y distribuir células a través de la circulación. Entre los días 12 - 16, el hígado fetal de ratón es el órgano hematopoyético más prominente, productor de CMHs y masiva expansión de eritrocitos. Entre los días 12 -13 de desarrollo se van estructurando los órganos periféricos como el timo y el bazo. A partir del día 16 de desarrollo la médula ósea adquiere su función como localización generativa y de maduración de progenitores hematopoyéticos que perdurará durante toda la vida adulta (Figura 2).

En cada una de estas localizaciones embrionarias las características de las células hematopoyéticas son diferentes tanto a nivel de células efectoras, progenitora o células madre hematopoyéticas. En general se denomina HEMATOPOYESIS PRIMITIVA a la generación de células hematopoyética en estadios tempranos de desarrollo. HEMATOPOYESIS DEFINITIVA a la generación de células hematopoyéticas a partir de día 10-11 de desarrollo, coincidiendo con la aparición de células madre hematopoyéticas definitivas en el AGM.

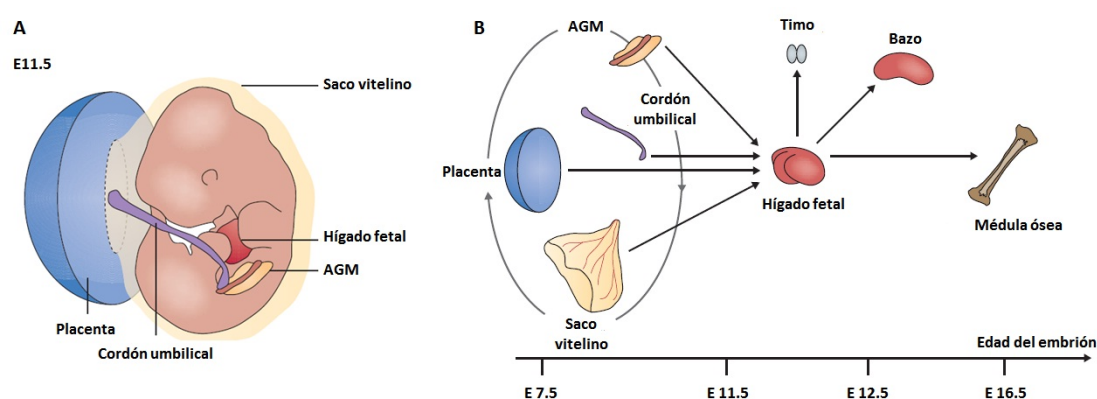


FIGURA 2. Desarrollo hematopoyético embrionario.

A. Esquema de un embrión de ratón a día 11.5 mostrando las diferentes localizaciones hematopoyéticas. B. Modelo de desarrollo de varios sitios hematopoyéticos. Progenitores hematopoyéticos y CMHs definitivas de las localizaciones mostradas en A se distribuyen a través de la circulación a partir de día 8 (como indica la flecha circular) y colonizan el hígado. Después de la expansión en el hígado, las CMHs definitivas colonizan la médula ósea, el bazo y el timo. En el adulto, el timo y el bazo son colonizados por progenitores de la médula ósea (no mostrado). (Medvinsky, Rybtsov et al. 2011)

A continuación describiremos el tipo de hematopoyesis descrita en cada localización.

Entre los días 6-7 de desarrollo embrionario de ratón se observan los primeros indicios morfológicos de aparición de células sanguíneas en el saco vitelino (Silver and Palis 1997). Estas células producen hemoglobina embrionaria y son nucleadas. La aparición temporal indujo a pensar que el origen de todas las células hematopoyéticas estaría en el saco vitelino. Diversos experimentos llegaron a demostrar que las células de saco podían generar en cultivo tanto células mieloides como eritroides (Moore and Metcalf 1970). Además cuando estas células eran trasplantadas intra-útero, o marcadas genéticamente sus descendientes podían encontrarse en la circulación del adulto (Weissman, Baird et al. 1977; Samokhvalov, Samokhvalova et al. 2007; Bockamp, Antunes et al. 2009) .

A partir del día 8 de desarrollo en el embrión propiamente dicho empiezan a aparecer células sanguíneas en la región AGM. Realizando un mapeo extensivo de las diferentes zonas del embrión los grupos de Medvinsky y colaboradores (Medvinsky, Samoylina et al. 1993; Kumaravelu, Hook et al. 2002), Cumano y colaboradores (Cumano, Ferraz et al. 2001) y Yoder (Yoder and Hiatt 1997) determinaron la aparición de los siguientes tipos de células progenitores hematopoyéticos: a) CFU-C (Unidades Formadoras de Colonias en cultivo, del inglés *colony forming units- culture*): que son progenitores mieloides formadores de colonias in vitro; b) CFU-S (Unidad Formadora de Colonias de Bazo, del inglés *colony-forming units spleen*): que se trata de progenitores inmaduros con actividad mieloide y eritroide, y progenitores de linfocitos; y c) Células multipotenciales capaces de repoblar receptores recién nacidos en trasplantes. Algunas de estas actividades también se han descrito en el saco vitelino a partir de día 9 de desarrollo (Yoder, Hiatt et al. 1997; Yoder, Hiatt et al. 1997; Lux, Yoshimoto et al. 2008) (Figura 3).

Sin embargo, solo a partir del día 11 de desarrollo emergen en el AGM las células madre hematopoyéticas tipo “definitivo”, es decir CMHs con capacidad de repoblar el sistema hematopoyético de un individual adulto irradiado, una vez que son trasplantadas al torrente sanguíneo (LTR-HSC, del inglés *long-term reconstituting hematopoietic stem cells* (Medvinsky and Dzierzak 1996) (Figura 3). Solamente una célula madre hematopoyética se puede obtener por embrión en estos estadios (Medvinsky, Rybtsov et al. 2011). Mientras que los progenitores hematopoyéticos CFU-C y CFU-S experimentan un progresivo incremento en el AGM, las células madre del AGM se expanden mínimamente. Se asume que las células madre hematopoyéticas migran del AGM al hígado donde proliferan hasta conseguir un número 50 veces superior al obtenido en el AGM. Las células madre del embrión comparten características fenotípicas con las células de médula ósea (Linaje-kit+) (Sanchez, Holmes et

al. 1996; North, de Bruijn et al. 2002), pero también presentan características propias como la expresión de Mac1, CD41 y VE-Cadherina, (Sanchez, Holmes et al. 1996; Rybtsov, Sobiesiak et al. 2011).

Tanto la placenta como la arteria vitelina poseen actividad hematopoyética de progenitores tipo CFU y también células madre hematopoyéticas que pueden repoblar la sangre cuando son transferidas a receptores irradiados. (Gekas, Dieterlen-Lievre et al. 2005; Ottersbach and Dzierzak 2005; Zovein, Turlo et al. 2010).

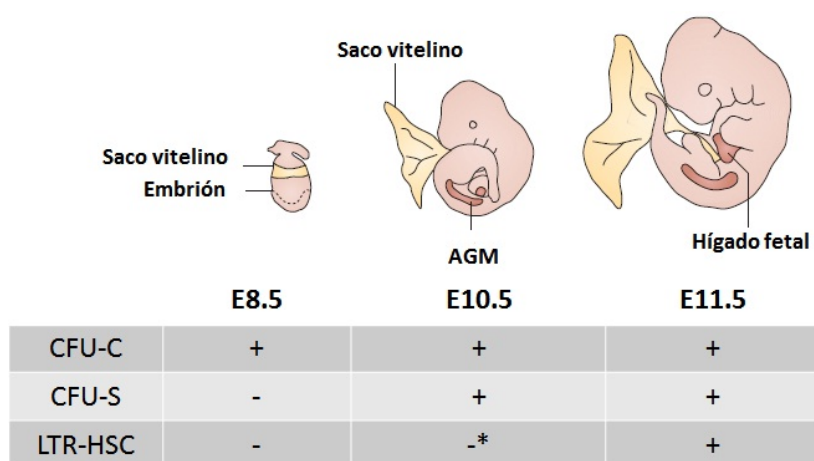


FIGURA 3. Tipos de células progenitoras hematopoyéticas durante el desarrollo embrionario de ratón.

Embriones a día 8.5 contienen CFU-C detectadas in vitro, pero no CFU-S o Células Madre Hematopoyéticas definitivas (CMHd). CFU-S se detectan por primera vez en E9 tardíos y E10 tempranos. La primera CMHd se detecta en E11. El * indica que en raras ocasiones pueden detectarse CMHs. CFU-C, unidades formadoras de colonias en cultivo (del inglés, *colony-forming units culture*); CFU-S, unidades formadoras de colonias de bazo (del inglés, *colony-forming units spleen*); LTR-HSC, células madre hematopoyéticas con potencial de reconstitución a largo plazo (del inglés, *Long-term reconstitution-Hematopoietic Stem Cells*). (Medvinsky, Rybtsov et al. 2011)

3.1.3 La región AGM

El AGM, deriva de la zona esplacnopleural e incluye: la aorta dorsal, los canales genitales y el mesonefros (del inglés, *Aorta-gonad-mesonephros*). Conectando la aorta dorsal con los canales urogenitales se encuentra el mesénquima peri-aórtico (Figura 4).

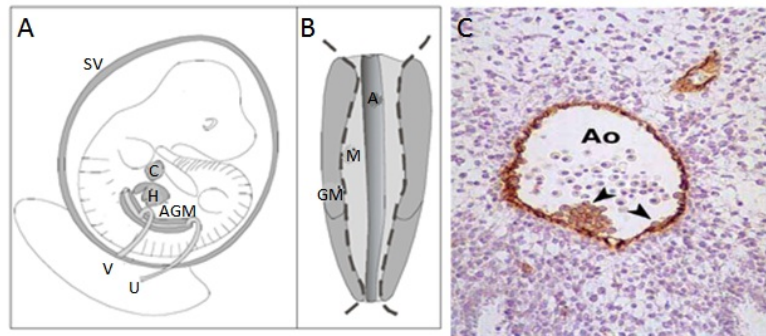


FIGURA 4. La región del AGM.

A) Localizaciones hematopoyéticas en embrión de estadio E10-E11, SV (saco vitelino), C (corazón), H (hígado), V (arteria Vitelina), U (arteria Umbilical), AGM (Aorta, Gonadas y Mesonefros). **B)** Diferentes estructuras que forman el AGM en estadio E10-E11, A (aorta), M (Mesénquima adyacente), GM (Gónadas y mesonefros). (Mendes, Robin et al. 2005) **C)** Corte transversal de la aorta dorsal donde se pueden observar agrupaciones de células asociadas a la pared ventral que representan CMHs.

El desarrollo del riñón y de las gónadas están íntimamente ligado a la zona AGM. La zona gonadal se especifica a partir de día 10 de desarrollo en la zona media/lateral interna del surco urogenital. Durante el desarrollo del riñón se distinguen tres zonas, el pronefros, la más primitiva, el mesonefros y el metanefros. El desarrollo del mesonefros comienza alrededor del día 10 embrionario, mediante la elongación del tubo nefrítico en respuesta al factor de crecimiento glial (GDGF) producido por células mesenquimales. Cada terminal tubular se rodea de un mesénquima especial que inducirá la formación de epitelios glomerulares y tubulares. A partir del día 12 de desarrollo los tubos anteriores desaparecen y el metanefros o riñón definitivo comienza a formarse en la parte posterior (Figura 5)

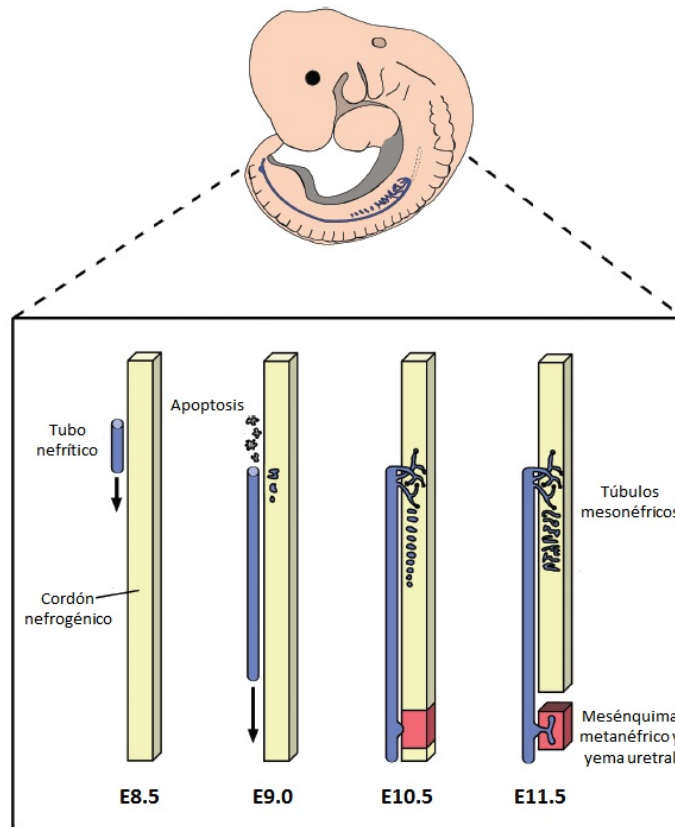


FIGURA 5. Visión general del desarrollo de riñón en los surcos urogenitales de la región AGM.

El desarrollo del riñón comienza en E8.5 con la formación del tubo nefrítico (azul) desde el cordón nefrogénico (amarillo). Precusores de la parte rostral del tubo nefrítico se pierden por apoptosis, mientras que los de la parte caudal crecen y se extienden por el cordón nefrogénico e inducen la formación de los túbulos mesonéfricos. En E10.5 el tubo nefrítico forma la yema uretral, que se convierte en una población especializada de células de la médula nefrogénica (rojo) llamada mesénquima metanéfrico. Las interacciones entre ambos darán lugar a la ramificación de la yema uretral y la formación de nefronas metanéficas y para generar el riñón definitivo. (Davidson 2008).

La aorta dorsal es inicialmente un vaso doble que se fusiona alrededor del día 9 de desarrollo embrionario en ratón. La zona ventral y dorsal proceden de diferentes derivados mesodérmico como elegantes experimentos en aves han demostrado (Pardanaud, Luton et al. 1996; Jaffredo, Richard et al. 2010). En general existe un consenso en considerar que las células madre hematopoyéticas se origina a partir de la zona ventral del endotelio aórtico. Morfológicamente, se asocia la aparición de CMHs a la formación de agrupaciones celulares en la zona ventral del lumen (Figura 4-C). Trasplantes de la zona urogenital y la pared de la aorta dorsal muestran que la CMHs casi exclusivamente se encuentran en la segunda (Taoudi and Medvinsky 2007). Por marcaje celular con CD45 y cultivos, también se han obtenido progenitores CFU-C y CFU-S de la zona que rodea a la aorta (de Bruijn, Peeters et al. 2000; Yokomizo and Dzierzak 2010). Recientemente se ha puesto de manifiesto

empleando cultivos de re-agregados la existencia de células pre-CMH (VE-Cad+CD45-CD41+) en la zona peri-vascular. Una vez en cultivo estas células pueden generar CMH definitivas (VE-Cad+CD45+) (Rybtsov, Sobiesiak et al. 2011).

A parte de células hematopoyéticas otros tipos de células progenitoras se han obtenido del AGM. Se ha determinado en AGM-E11 la presencia de células endoteliales VE-Cad+CD45- capaces de originar colonias en co-cultivos con la línea celular OP9 (Taoudi, Morrison et al. 2005). Se desconoce su potencial en trasplante. Así mismo, el grupo de Minasi y colaboradores empleando trasplante de AGM E9 en sistema de codorniz/pollo y ratón demostró la existencia de una población capaz de generar sangre, endotelio, cartílago, hueso y musculo cuando se trasplanta, denominada “meso-angioblasto” (Minasi, Riminucci et al. 2002). Posteriormente el grupo de Dzierzak determinó que células mesenquimales con capacidad de generar in vitro condriocitos, adipocitos y osteocitos, se obtienen exclusivamente del AGM a día E11-E12 (Mendes, Robin et al. 2005) emergiendo casi simultáneamente con las CMHs.

3.1.4 El hígado fetal. Células madre fetales difieren de las adultas.

Alrededor de día 8 de desarrollo se producen las primeras señales inductoras para la formación del hígado en ratón. La pared ventral del epitelio intestinal anterior, adyacente al corazón, recibe señales de la zona cardiaca que inducen al endodermo a iniciar el desarrollo hepático. A partir del estadio E9, se forma un divertículo hepático que dará lugar al hígado y a los canales biliares. Las células del endodermo hepáticas, hepatoblastos, se laminan del epitelio e invaden el mesénquima del septo transversal adyacente para formar el hígado. Algunos consideran que el septo transversal es la fuente de células estrelladas y endoteliales sinusoidales que comienzan a formar vasos. A día 10 de desarrollo empieza a crecer la vascularización y se observan las primeras células hematopoyéticas (Figura 6).

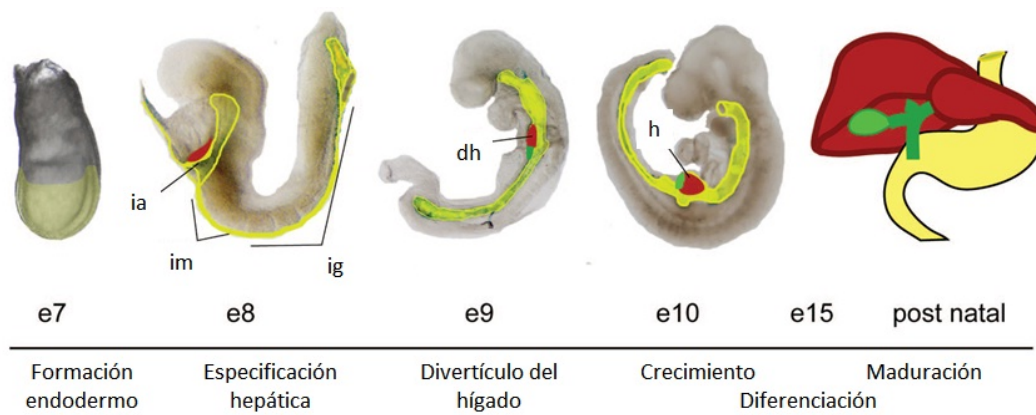


FIGURA 6. Desarrollo del hígado de ratón.

El esquema muestra los embriones de ratón en las diferentes etapas de desarrollo con el endodermo resaltado en amarillo, el hígado en rojo y la vesícula biliar en verde. Los acontecimientos de desarrollo más importantes se enumeran a continuación. La capa de endodermo se forma durante la gastrulación (E6.5-E7.5). En E7-E8.5 el endodermo forma un tubo intestinal a lo largo de un eje anterior y posterior dividido en intestino anterior (ia), intestino medio (im) e intestino grueso (ig). En E8.5 hay una especificación hepática de una porción del intestino adyacente al corazón. El divertículo del hígado (dh) se forma en E9 y se expande en E10. El hígado crece, y alrededor del día 15 los hepatoblastos se diferencian en hepatocitos y células biliares. La maduración final del hígado es gradual y continúa en el periodo postnatal. (Zorn 2008)).

El hígado es un órgano fundamentalmente hematopoyético entre los estadios E10-14 y se produce un gran crecimiento del volumen celular eritroide. Las primeras células madre hematopoyéticas se detectan a partir del estadio E11.5. Es en este órgano donde entre los estadios E12– E14 se produce la mayor expansión de CMHs en todo el embrión (50 – 100 veces). Los factores que determinan este crecimiento aun no se conocen.

Mientras que el AGM constituye la zona por excelencia para abordar estudios sobre generación de CMHs a partir de progenitores de diferente naturaleza, el hígado ha sido el órgano de elección para estudio de la biología y comportamiento de las células madre hematopoyéticas del embrión/feto. En los últimos años nuestro grupo junto con otros laboratorios han trabajado en la caracterización de precursores hematopoyéticos de hígado fetal y las redes de regulación transcripcional mediadas por el gen SCL. En el curso de estos estudios se ha demostrado que las CMHs del hígado fetal poseen características propias y distinguibles de los progenitores adultos. Difieren de las CMHs adultas en el potencial de diferenciación (Ikuta, Kina et al. 1990; Hardy and Hayakawa 1991), expresión de genes (Ivanova, Dimos et al. 2002), marcadores (Morrison, Hemmati et al. 1995; Sanchez, Holmes et al. 1996), y regulación molecular (Pina and Enver 2007). Es más se ha demostrado que ciertos genes como el Sox17 son necesarios para la formación de células fetales pero no adultas (Kim, Saunders et al. 2007) y su sobreexpresión en células adultas puede

transformarlas en células con características fetales (He, Kim et al. 2011). La transición de CMHs fetal a adultas, ocurre entre 2-3 semanas después del nacimiento en los ratones (Kikuchi and Kondo 2006; Bowie, Kent et al. 2007) (Figura 7). Aunque los mecanismos no se entienden muy bien, las ventajas de injerto de células derivadas de hígado fetal están probablemente asociadas con su alto estado de proliferación comparado con la naturaleza quiescente de las CMHs derivadas de médula ósea adulta (Bowie, Kent et al. 2007). Determinar si esta superior capacidad repobladora se aplica a los progenitores endoteliales en trasplantes, es objetivo principal en este trabajo de tesis doctoral.

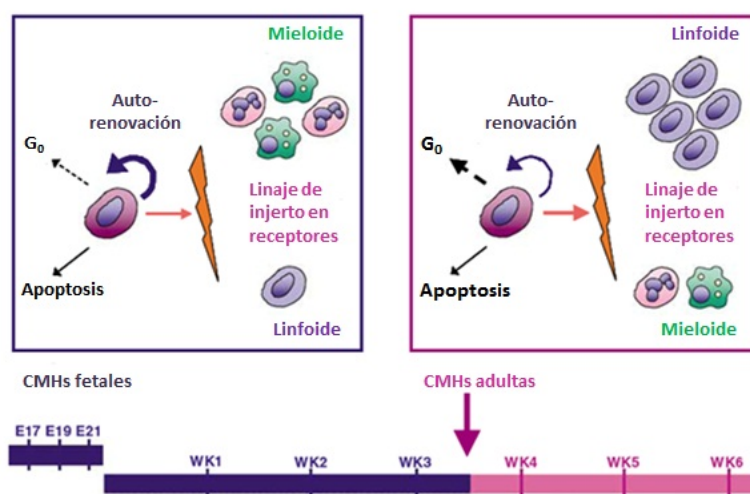


FIGURA 7. Transición de células madre hematopoyéticas fetales a adultas.

Se producen cambios en las propiedades de proliferación, auto-renovación y diferenciación a linaje. CMHs de ratón fetal o neonatal son células que proliferan y se auto-renuevan con divisiones simétricas, y originan células de linaje mieloides cuando se trasplantan en animales irradiados. Entre la tercera y cuarta semana después del nacimiento, las CMHs son sometidas a cambios para generar CMHs adultas. Las CMHs adultas son quiescentes o proliferan más lentamente, participan en divisiones asimétricas, y generan linaje linfoides cuando se trasplanta en animales irradiados. (Pina and Enver 2007)

3.2 Desarrollo del sistema vascular

El sistema circulatorio en el adulto está formado por arterias, venas y vasos linfoides conectados por redes de microvasculatura o capilares. En general, la estructura de la pared de un vaso se compone de una capa de células endoteliales enfrentadas al lumen rodeada de una capa de células musculares de diferente grosor dependiendo de los vasos (Figura 1). Además, las células endoteliales se suelen asociar a células murales o pericitos de naturaleza muscular (Carmeliet 2000). Las células endoteliales presentan marcadores y funciones muy distintas dependiendo del órgano donde se localizan. No solo ejercen un papel canalizador

del tráfico celular y de nutrientes, sino que además pueden ejercer una función remodeladora y paracrina durante la organogénesis y homeostasis (Crivellato, Nico et al. 2007). En el embrión la estructura de los vasos es más simple, consistiendo en general, en una capa de células endoteliales que, a medida que van formando vasos estables, se acompañan de células murales musculares (*Handbook of Stem Cells Vol.2 p455-p474; Stenmark & Abman. Annu Rev Physiol 2005*). Las células endoteliales y musculares vasculares derivan del mesodermo.

3.2.1 Origen

Durante el desarrollo temprano el mesodermo se divide en mesodermo posterior y mesodermo lateral (E5-6 desarrollo de ratón). El posterior origina mayoritariamente la red vascular extraembrionaria del saco vitelino. El mesodermo lateral se divide en dorsal (mesodermo somatopleural) y ventral (mesodermo de esplácnico). Cada uno da origen a células endoteliales con diferentes dominios de integración. Así, el endotelio de la zona ventral de la aorta dorsal proviene de las células endoteliales derivadas del mesodermo esplácnico (Pardanaud, Luton et al. 1996). (Figura 8).

3.2.2 Formación de los plexus vasculares

Una vez generados los primeros precursores endoteliales (angioblastos), se tienen que formar rápidamente la red de conexiones arteriales y venosas para acomodar el bombeo del corazón y establecer así la circulación primaria. Durante el desarrollo, se produce la diferenciación y la migración de algunos precursores endoteliales, y estas células se unen para formar un plexo capilar primario, en un proceso llamado VASCULOGENESIS. El plexo capilar primario está caracterizado por una red en forma de panel de canales vasculares de un diámetro uniforme. Esta red vascular puede ser claramente identificada en el saco vitelino y en la región cefálica a día 8 de gestación. Posteriormente, el plexo capilar primario experimenta procesos morfo genéticos, ramificaciones, proliferación, formación de lumen, remodelación y conexión con otras redes vasculares que generaran una circulación efectiva (Geudens and Gerhardt 2011). Los vasos forman una red más compleja y otras células diferentes de las endoteliales se involucran en el proceso, tales como células del músculo liso. Esta última fase del desarrollo vascular se conoce como ANGIOGENESIS (Figura 8).

3.2.3 Angiogenesis

Durante esta fase de desarrollo en ratón (E8) se van formando grandes vasos como la aorta dorsal. A medida que el embrión crece, el flujo va fortaleciendo los grandes vasos y algunas redes sinusoidales se desconectan y se retraen hasta desaparecer. Estas redes sinusoidales en el proceso denominado REMODELACION VASCULAR volverán a formar otros vasos venosos (le Noble, Moyon et al. 2004). Un importante factor que regula la remodelación es el oxígeno, controlando la densidad vascular (Claxton and Fruttiger 2005). La estabilización de los vasos formados depende de los pericitos, aunque no está determinado si también intervienen en la regresión (Armulik, Genove et al. 2011). Es más, las células endoteliales conservan cierta plasticidad, en cuanto a su capacidad para incorporarse en vasos arteriales o venosos, como han descrito trabajos de trasplante en embriones de pollo/codorniz y reconstrucción de conexiones en vasos de saco vitelino (le Noble, Moyon et al. 2004). Así mismo es interesante mencionar que la naturaleza de las células endoteliales es diversa y depende no solo del estadio de diferenciación sino también del órgano en que se encuentra (Lammert, Cleaver et al. 2003). Recientemente se han caracterizado la expresión de diferentes marcadores para células endoteliales arteriales (ephrinB2), venosa (EphB4) o linfáticas (Lyve-1) (Carmeliet 2003). Este factor ha contribuido a entender el desarrollo del sistema vascular a nivel molecular.

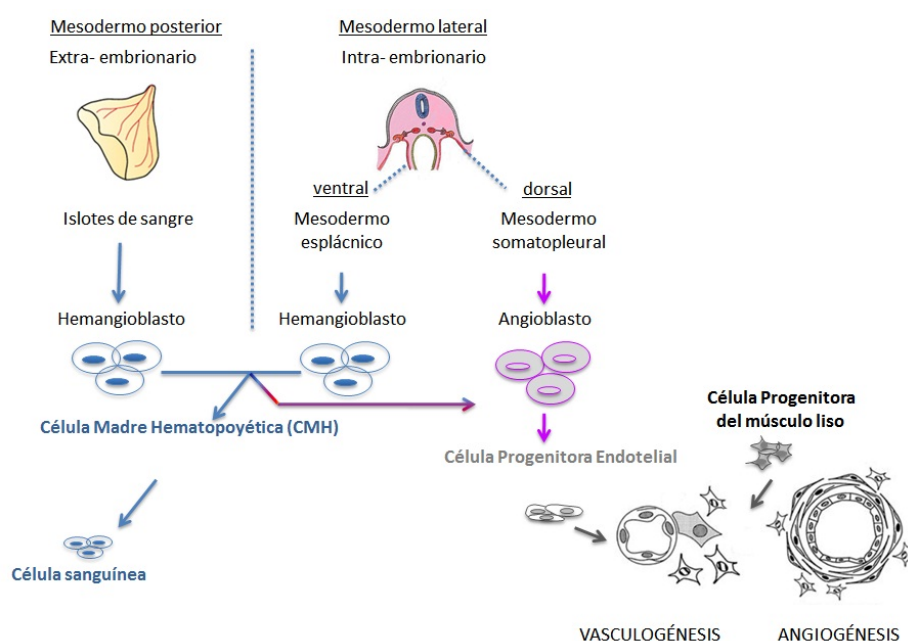


FIGURA 8. Origen y formación de vasos sanguíneos.

Fuera del embrión, los vasos sanguíneos se originan a partir de un hemangioblasto bipotencial en las islas de sangre del saco vitelino, que generan células hematopoyéticas y endoteliales. Dentro del embrión, dependiendo de la localización, el endotelio se forma desde precursores endoteliales monopotenciales (angioblastos) o hemangioblastos bipotenciales. Más tarde se producen las células madre hematopoyéticas y las células endoteliales. Estas últimas se unen en una red primitiva (vasculogénesis), que posteriormente se expanden por angiogénesis y madura por adquisición de células del músculo liso y matriz extracelular.

3.2.4 Estructura de la vasculatura de algunos órganos en el adulto

Los vasos sanguíneos son parte del sistema circulatorio y se clasifican en tres tipos generales: arterias, venas y capilares. La estructura básica consiste en una capa de células endoteliales que se asocian a pericitos o células murales de naturaleza muscular, rodeada por otras capas de células musculares lisas y tejido conectivo de diferente complejidad en arterias y venas. Cada órgano presenta una distribución vascular adaptada a su fisiología y con células endoteliales especializadas. Así, en el hígado adulto (Figura 9A) la unidad básica de su arquitectura es el lóbulo que consta de un sistema de vasos sanguíneos llamado “triada portal” compuesta por una vena portal, un conducto biliar y una arteria hepática. Además están las células endoteliales que forman los capilares sinusoidales alrededor de los hepatocitos que facilitan la transferencia de secreciones endocrinas desde los hepatocitos hacia el torrente sanguíneo. En el riñón la vasculatura forma unas estructuras muy especializadas denominadas red capilar glomerular. Aquí el sistema vascular está asociado a las nefronas y túbulos renales que se encuentran dentro de una estructura piramidal dividida en corteza y médula (Figura 9B). La arteria renal se divide en arterias inter-lobulares que en la cápsula recorren la inter-fase córtex- médula y terminan en una estructura capilar compleja en el glomérulo, encargado de filtrar la sangre en la médula. El corazón es el órgano principal del aparato circulatorio. Es un órgano musculoso que impulsa la sangre por todo el cuerpo. Está dividido en 4 cavidades (2 aurículas y 2 ventrículos). Recibe sangre por las venas cavas y una vez oxigenada la impulsa hacia la arteria aorta. En la estructura cardíaca se distinguen dos partes, la envoltura externa llamada pericardio y una segunda estructura que es la pared cardíaca formada por tres capas: Epicardio, miocardio y endocardio. Formadas por tejido conectivo y células cardíacas por donde se integran capilares cardíacos.

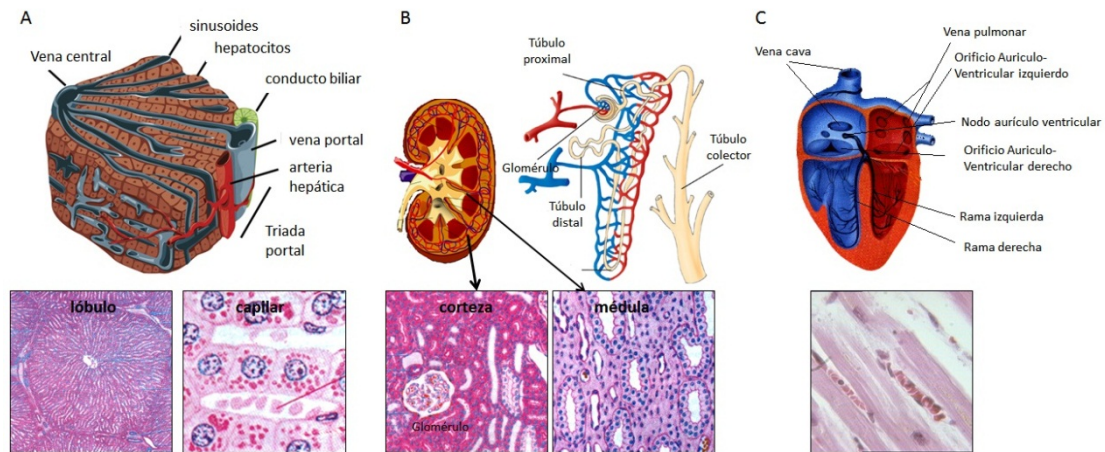


FIGURA 9. Arquitectura de órganos adultos. (A) Estructura del hígado. Arriba se muestra una porción de lóbulo donde están dibujados los hepatocitos (rojo) formando placas hepáticas separadas por espacios sinusoidales que radian hacia la vena central. El canalículo biliar drena bilis a los hepatocitos (verde), que corren en paralelo a la vena portal (azul) y la arteria hepática (rojo) para formar la triada portal. Abajo se muestran una sección de un lóbulo y de un capilar sinusoidal. **(B) Estructura del riñón.** Se organiza en estructuras piramidales divididas en corteza y médula. Las nefronas se encuentran dentro de esta estructura e incluyen los glomérulos y un túbulo que se divide en proximal, medio y distal, importante en el filtrado glomerular. **(C) El corazón** se divide en cuatro cámaras o cavidades cardíacas, dos aurículas y dos ventrículos. Además de los grandes vasos encargados de la circulación pulmonar y sistémica, se aprecian capilares dispuestos en los espacios conectivos, entre las células musculares.

3.3 El hemangioblasto y el endotelio hemogénico

3.3.1 El hemangioblasto

Durante el desarrollo embrionario, las células madre hematopoyéticas y los angioblastos, que dan lugar a las células de la sangre y las células endoteliales, respectivamente, se generan de la capa de células germinativas del mesodermo. Cómo se generan y se diferencian aún no está claro. La hipótesis del precursor común para sangre y endotelio, el hemangioblasto, fue propuesta hace cerca de cien años (Murray, 1932; Sabin, 1920) (Figura 8 y 10).

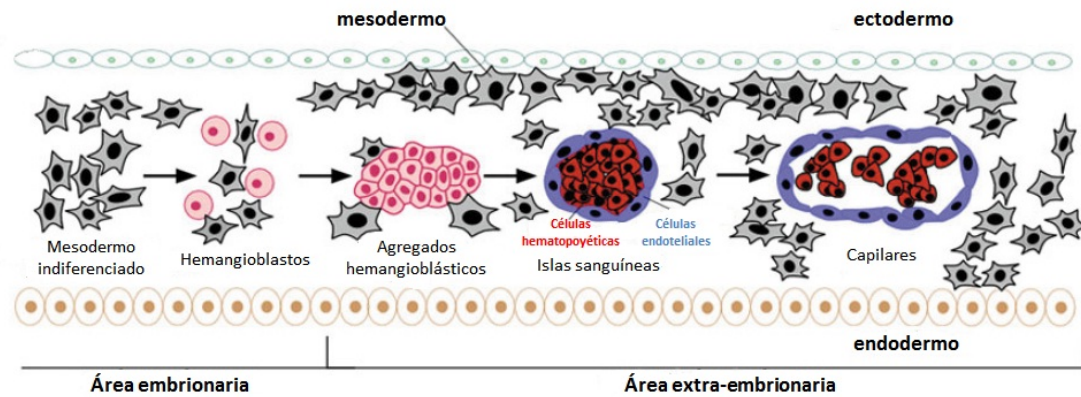


FIGURA 10. Base morfológica de la existencia del hemangioblasto en el saco vitelino a estadios tempranos del desarrollo. Las células recién formadas del mesodermo migran hacia el saco vitelino. Durante la migración, los precursores se agrupan formando agregados hemangioblásticos. Las células periféricas de los agregados se aplanan y se diferencian a células endoteliales, mientras que las células situadas en la zona central se diferencian a células hematopoyéticas. La aparición simultánea de células endoteliales y hematopoyéticas en las islas de sangre condujo a la hipótesis de que derivaban de un precursor común, el hemangioblasto. (Eichmann, Yuan et al. 2005).

Posteriormente, su existencia se ha demostrado usando células madre embrionarias in vitro (Fehling, Lacaud et al. 2003) y también en las primeras etapas embrionarias en el ratón (Huber, Kouskoff et al. 2004). Es mas, empleando marcajes de una sola célula y siguiendo su linaje in vivo con técnicas de alta resolución se ha mostrado como se puede originar sangre y endotelio en pez cebra (Vogeli, Jin et al. 2006). Sin embargo mas recientemente, trabajos combinando cultivos de células madre embrionarias y células obtenidas de estadios tempranos de ratón, parecen mostrar que el proceso de diferenciación del hemangioblasto sería a través de una célula endotelial especial denominada hemogénica que posteriormente se diferenciaría a sangre. El primer paso estaría mediado por el gen SCL y el segundo por Runx1, dos factores de transcripción esenciales para la formación de sangre en el embrión (Lancrin, Sroczynska et al. 2009; Medvinsky, Rybtsov et al. 2011) (Figura 11). En general se considera que el hemangioblasto es un progenitor solo presente en estadios muy tempranos de desarrollo.

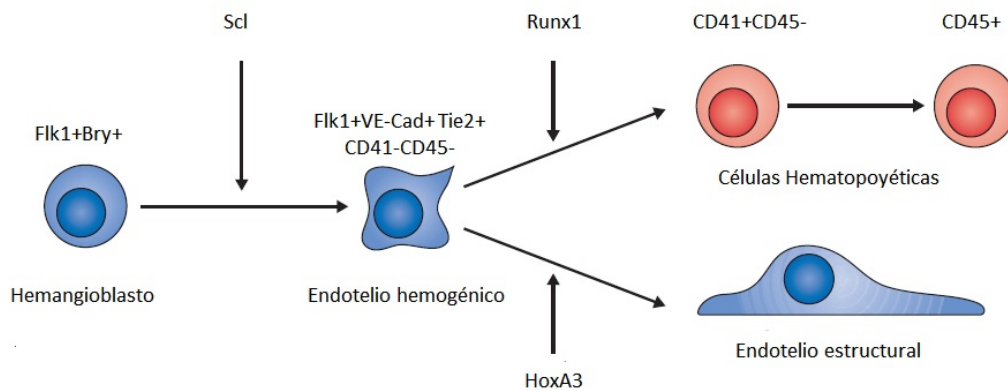


FIGURA 11. Transición de hemangioblasto a endotelio hemogénico.

El esquema muestra como un hemangioblasto a través de un estado previo de endotelio hemogénico genera células hematopoyéticas. El endotelio hemogénico puede generar células hematopoyéticas y endotelio. Los marcadores permiten identificar cada una de las etapas indicadas. La formación de endotelio hemogénico depende de SCL y las células hematopoyéticas de Runx1. HoxA3 antagoniza el programa hematopoyético y mantiene las células con características endoteliales. (Medvinsky, Rybtsov et al. 2011)

3.3.2 Endotelio hemogénico

La observación morfológica de la aparición de agrupaciones celulares hematopoyéticas íntimamente unidas al endotelio ventral de la aorta dorsal embrionaria del embrión, hizo sugerir hace mas de una década que el origen de las células hematopoyéticas (o células madre hematopoyéticas) podrían ser las células endoteliales (Jaffredo, Gautier et al. 1998; Dieterlen-Lievre, Pouget et al. 2006). Numerosos estudios posteriores realizados en los últimos años han confirmado la existencia en el embrión de un endotelio especial, denominado ENDOTELIO HEMOGENICO capaz de generar células sanguíneas. Diversas estrategias como el seguimiento del linaje de células marcadas in vivo en pez (Bertrand, Chi et al. 2010) y en ratón (Zovein, Hofmann et al. 2008), imágenes in vivo de cultivos del AGM (Boisset, van Cappellen et al. 2010) y el cultivo clonal de células madre embrionarias constituyen argumentos solidos de la existencia del endotelio hemogénico (Figura 12). Los lechos vasculares con actividad hematopoyética se han descrito en el AGM, saco vitelino, placenta y las arterias vitelinas y umbilicales (de Bruijn, Ma et al. 2002; Yokomizo and Dzierzak 2010; Zovein, Turlo et al. 2010). En general se acepta que la actividad de endotelio hemogénico es temporal y asociada a vasculatura arterial (You, Lin et al. 2005).

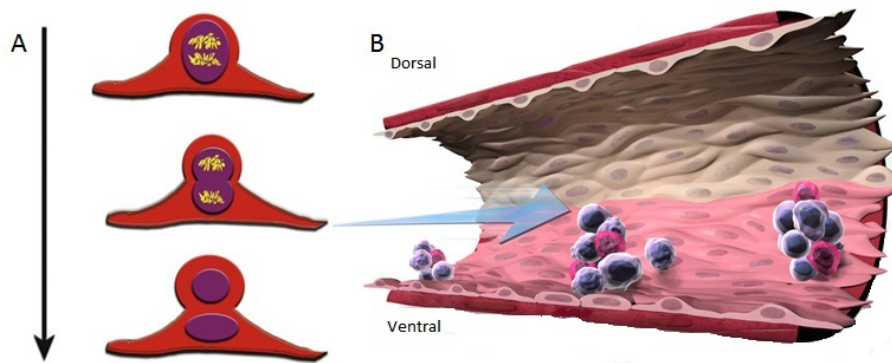


FIGURA 12. Maduración de progenitores hematopoyéticas desde el endotelio hemogénico en la aorta a nivel del AGM.

A. Las células hematopoyéticas parecen estar en contacto directo, y posiblemente en continuo, con la capa del endotelio, del cuál surgen de un posible proceso de división asimétrico como indica la flecha (↓). **B.** Los precursores hematopoyéticos sobresalen a la luz del vaso, estas células son heterogéneas en su composición y pueden contener células de varios linajes hematopoyéticos, así como CMHs. (Zape and Zovein 2011; Adamo and Garcia-Cardena 2012)

El tipo de sangre que dan los endotelios hemogénicos es variable. Así, hace mas de una década, el grupo de Nishikawa demostró que células VE-Cadherina+, CD45-, TER119- (potencialmente células endoteliales) de embriones de día 9.5 (el hemangioblasto ya se habría extinguido en este estadio) podrían generar células hematopoyéticas mieloides y linfocitos (Nishikawa, Nishikawa et al. 1998). En el AGM, las células emergentes del endotelio ventral (VE-Cadherina+CD45-), se consideran células madre hematopoyéticas y expresan marcadores específicos de sangre (CD45, CD41, CD11b) (Boisset, van Cappellen et al. 2010). Las células hematopoyéticas se de-laminan del endotelio aórtico, y este pierde células endoteliales. Es mas como un proceso de trans-diferenciación que de generación madre-hija. Este mecanismo justificaría que con el tiempo se vaya perdiendo el endotelio hemogénico. En otras localizaciones como las islas sanguíneas de los vasos mesentéricos en estadio E9-E10 se ha propuesto que la sangre se origina no directamente del endotelio de los grandes vasos sino de vasculatura que está en el proceso de remodelación endotelial (Zovein, Turlo et al. 2010). Los mecanismos de formación de células sanguíneas a partir del endotelio es un tema de activa investigación.

4. EL GEN SCL, FUNCIÓN EN EL SISTEMA HEMATO-VASCULAR Y VECTORES DE EXPRESIÓN

El gen SCL (*Stem Cell Leukemia*), también conocido como TAL-1 (*T cell Acute Leukemia-1*), codifica un factor de transcripción hélice- lazo- hélice, expresado en células madre hematopoyéticas (CMHs), eritrocitos, megacariocitos, así como en angioblastos, células endoteliales maduras, , y áreas específicas del sistema nervioso central (Begley and Green 1999). Este gen es esencial para la especificación a partir del mesodermo de células hematopoyéticas durante el desarrollo embrionario y para remodelar la vasculatura del saco vitelino primario (Shivdasani, Mayer et al. 1995). Su inactivación durante el desarrollo tiene como resultado defectos vasculares y la carencia total de sangre produciendo la muerte del embrión alrededor del día 9 de desarrollo. En pez cebra se ha descrito que su exceso de producción induce un incremento en el número de células sanguíneas y endoteliales a la vez que se disminuye la producción de células musculares mesodérmicas (Gering, Rodaway et al. 1998). En general se acepta que SCL se necesita para la determinación del hemangioblasto y mas tarde en el desarrollo para la maduración de células eritroides y megacariocitos (D'Souza, Elefanty et al. 2005). Colonias de células hemangioblásticas obtenidas de la línea primitiva de embriones de estadio E7.5 tienen el potencial de generar células hematopoyéticas, vasculares y musculares (Huber, Kouskoff et al. 2004). Mutantes condicionales de SCL ponen de manifiesto que SCL no es fundamental para la generación de CMH definitivas (Hall, Slater et al. 2005), sin embargo tiene un importante papel en la coordinación de la red transcripcional que modula la diversidad de CMH con función repoblación sanguínea a corto y largo plazo (Wilson, Foster et al. 2010). Es más, la expresión de SCL en embriones mutante SCL^{-/-} rescata la hematopoyesis y el defecto vascular (Sanchez, Bockamp et al. 2001; Bloor, Sanchez et al. 2002). La falta de función de SCL en adulto tampoco parece afectar drásticamente a la vasculatura, sin embargo ensayos in vitro muestran que este factor de transcripción tiene un papel importante en migración y formación de redes tubulares en cultivo (Deleuze, Chalhoub et al. 2007).

4.1 El vector de expresión SCL3'Enh-PLAP

Los marcadores de seguimiento de linaje celular y manipulación genética constituyen herramientas esenciales para abordar el estudio de la contribución hemato-vascular de progenitores en trasplantes. Marcadores de este tipo lo proporcionan vectores de expresión

que tienen secuencias reguladoras o *enhancers* específicos de linajes celulares, activos en transgénesis. Las secuencias reguladoras del gen SCL constituyen, por tanto, potenciales elementos de expresión génica para generar vectores activos en progenitores hemantiblasticos, CMHs y endotelio en transgénesis.

El mecanismo de regulación del locus SCL se ha analizado extensamente identificándose cinco secuencias reguladoras independientes, cada una de las cuales dirige la expresión de un subdominio específico del patrón de expresión normal de SCL (Sanchez, Gottgens et al. 1999; Gottgens, Barton et al. 2000). Entre ellos, el enhancer 3' de 5,5 Kb presenta actividad en endotelio vascular y progenitores hematopoyéticos durante del desarrollo de ratón (Sanchez, Bockamp et al. 2001; Gottgens, Nastos et al. 2002).

Estudios posteriores mostraron que la actividad hemato-vascular del 3'Enhancer radica en sólo 644pb situadas 19 Kb en dirección 3' del sitio de iniciación de la transcripción de SCL (Silberstein, Sanchez et al. 2005). El vector que empleamos en estos estudios contiene un promotor vírico SV y el fragmento del 3'Enhancer dirigiendo la expresión de gen reportero de la fosfatasa alcalina de la placenta humana (hPLAP) denominado SCL3'Enh-PLAP (Figura 12). Tanto el vector que incluye el fragmento de 5.5 kb (SCL3'Enh-lacZ) como el vector de 644pb (SCL3'Enh-PLAP) se expresan en secciones de embriones de día 11-12 en la vasculatura y en células hematopoyéticas del AGM, en el saco vitelino y en el hígado fetal. Así mismo experimentos de trasplante con células SCL3'Enh+ de hígado fetal y la medula ósea de adulto ponen de manifiesto la existencia de células madre hematopoyéticas en esta población (Sanchez, Gottgens et al. 1999; Sanchez, Bockamp et al. 2001; Silberstein, Sanchez et al. 2005).

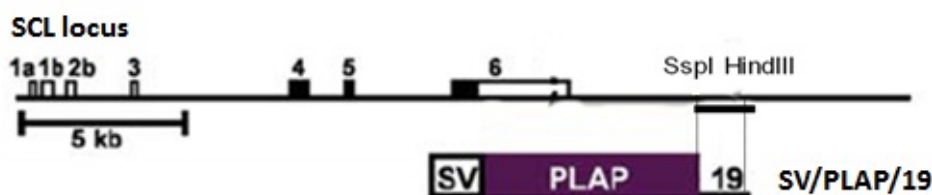


FIGURA 13. Esquema del vector de expresión SCL3'EnhPLAP.

Arriba se representa el locus SCL con cuatro exones y tres intrones. Un fragmento de 644 pares de bases cortado por las enzimas de restricción SspI e HindIII es el que contiene el enhancer +19 que forma parte del vector SCL3'Enh-PLAP. El vector está compuesto por las secuencias del promotor mínimo del simian virus (SV), la secuencia del gen testigo de la fosfatasa alcalina de la placenta humana y el enhancer +19, también incluye la señal SV40 de poliadenilación, y el segundo intrón del gen de la β -globina de conejo (que incrementa la expresión génica).

JUSTIFICACIÓN Y

OBJETIVOS

Las células madre y progenitores hematopoyéticos derivados de médula ósea de adulto regeneran todas las células del sistema sanguíneo en trasplantes. También pueden contribuir a la vasculatura e intervenir en la recuperación de vasos dañados mediante la producción de factores de crecimiento endotelial o mediante la diferenciación a endotelio. Sin embargo esta contribución vascular es muy limitada.

Menos se conoce sobre el potencial vascular en trasplantes de poblaciones celulares fetales procedentes de localizaciones hematopoyéticas. Considerando la estrecha relación ontogénica que existe entre el sistema hematopoyético y vascular, y el superior potencial de injerto hematopoyético de células de origen fetal, este proyecto propone el estudio y caracterización de los precursores hemato-vasculares durante el desarrollo embrionario de ratón con el fin de identificar progenitores endoteliales con alta eficiencia de repoblación vascular en trasplantes.

- **Objetivo 1: Potencial hemato-vascular en trasplantes de células de hígado fetal versus adultas.**

Los progenitores endoteliales con capacidad de integrarse en la vasculatura una vez trasplantados pueden derivar de células madre hematopoyéticas y progenitores mieloides localizados en la circulación y médula ósea de individuos adultos. Sin embargo, estos progenitores contribuyen pobremente al endotelio vascular. Basándonos en la superior capacidad de injerto de los progenitores hematopoyéticos del hígado fetal, el objetivo aquí propuesto es analizar si las células de hígado fetal también presentan progenitores con superior capacidad de repoblación vascular endotelial en diferentes órganos y como el condicionamiento del receptor influye en el injerto.

- **Objetivo 2: Caracterización fenotípica y funcional de los precursores hemato-vasculares en el hígado fetal.**

Mediante el uso de marcadores de progenitores hemato-vasculares que permitan fraccionar las células de hígado fetal por citometría de flujo, se propone identificar la población o poblaciones responsables de la contribución vascular y determinar su relación con el linaje hematopoyético en trasplantes.

- **Objetivo 3: Análisis de la distribución espacio-temporal de progenitores hemato-vasculares durante el desarrollo embrionario de ratón.**

Dado que la hematopoyesis ocurre de forma secuencial en diferentes sitios embrionarios, es interesante determinar cuándo y dónde surgen progenitores endoteliales. La mayoría de experimentos para determinar el potencial vascular de células embrionarias se han realizado in vitro y menos se conoce sobre el potencial en trasplantes. Se propone analizar el potencial de diferenciación endotelial-vascular y hematopoyético en todas las localizaciones hematopoyéticas a diferentes estadios de desarrollo.

- **Objetivo 4: Sistemas de cultivo para TEPCs (*Células Progenitoras Endoteliales Trasplantables*)**

Se determinará si sistemas de cultivos in vitro capaces de expandir CMHs y CPHs, tiene potencial de generar y/o expandir una población de células progenitoras con potencial de repoblación vascular en trasplantes. También se comparará el comportamiento de progenitores endoteliales aislados de diferentes localizaciones hematopoyéticas mediante el uso de ensayos de diferenciación vascular in vitro.

- **Objetivo 5: Aspectos sobre la repoblación vascular de células de hígado fetal trasplantadas en recién nacidos.**

Se evalúan las condiciones y el tiempo necesario para que células de hígado fetal injerten en el sistema vascular del recién nacido. Cuestionándonos aquí si existe alguna relación entre la extensión del injerto vascular y el tiempo transcurrido después del trasplante.

MATERIALES Y MÉTODOS

RATONES TRANSGÉNICOS

Todos los ratones empleados tienen un fondo genético híbrido (C57BL/6 x CBA). Los animales se mantuvieron a temperatura y humedad relativa constantes en racks ventilados (Techniplast), con un fotoperiodo artificial de 12 horas en las instalaciones del animalario del Centro Andaluz de Biología del Desarrollo, en la Universidad Pablo de Olavide. Todos los protocolos de manipulación se realizaron bajo la guía de legislación de la Comunidad Europea con la aprobación del comité ético del CSIC y de la Universidad Pablo de Olavide.

Ratones transgénicos para la construcción SV40/PLAP/19 (SCL3'Enh-PLAP)

Fueron generados en el Servicio de Biología de la Universidad de Cambridge mediante inyección en pronúcleo de embriones de ratones (C57BL/6 x CBA). El vector de expresión incluye: a) el promotor mínimo SV40 obtenido del plásmido pGL-2 (Promega, Madison, WI, <http://www.promega.com>), b) el segundo intrón de la β globina de conejo, que aumenta la expresión del transgén en ratón, obtenido de plásmido pSG5 (Stratagene, La Jolla, CA, <http://www.stratagene.com>), c) el gen de la fosfatasa alcalina de la placenta humana (hPLAP), incluyendo la señal de poliadenilación SV40, subclonado a partir del plásmido APpA3, y d) la secuencia reguladora +19, un fragmento de ADN genómico de ratón de 644pb localizada 19kb en posición 3' del promotor del gen SCL. Este fragmento fue subclonado de la construcción SV/lacZ/19 e insertado en posición 3' del gen PLAP para generar la construcción SV40/PLAP/19 (Silberstein, Sanchez et al. 2005). SCL3'EnhPLAP dirige la expresión de PLAP en un subconjunto de células endoteliales y sanguíneas en múltiples sitios hematopoyéticos del embrión y adulto. La línea transgénica empleada es la L1791.

Ratones transgénicos para la construcción 6E5/LacZ/3'Enhancer (SCL3'Enh-LacZ)

Fueron descritos previamente (Sanchez, Gottgens et al. 1999). En la construcción del transgén, el gen lacZ que incluía la señal de poliadenilación SV40 fue subclonada del plásmido pSDK lacZpA (donado por el Dr. J. Rossant) dentro del plásmido pGL-2 (Promega). El fragmento de ADN genómico SCL fue obtenido de la librería genómica de Balb/c (Begley,

Robb et al. 1994) y subclonado en el vector pGL-2 como ya se ha descrito (Gottgens, McLaughlin et al. 1997) . La construcción transgénica +6E5/lacZ, contiene el promotor endógeno del gen SCL localizado en el exón 4. El 3'Enhancer es un fragmento de 5.5kb BglII/BglII localizada 14kb en posición 3' del promotor 1a. El fragmento de 5.5kb fue subclonado en posición 3' del gen lacZ para generar la construcción 6E5/lacZ/3'Enh. La línea transgénica empleada es la L2269.

Ratones transgénicos DsRed, variante T3

Ratones procedentes de los Laboratorios Jackson (STOCK de Tg (ACTB-DsRed*MST) 1Nagy/J y el número de referencia 005441), cedidos por el Dr. M. Dolado. Expresan la proteína fluorescente roja variante DsRed*MST bajo el control del promotor de beta actina de pollo unido al citomegalovirus (CMV) al principio del potenciador. Estos ratones expresan la proteína fluorescente roja con una longitud de onda que penetra en los tejidos de una forma superior a otras variantes espectrales con menor longitud de onda (por ejemplo GFP), y es preferible ya que disminuye el fondo auto-fluorescente de los tejidos. Presenta bajos niveles de toxicidad celular, observada anteriormente en otras variantes por deterioro intracelular de la proteína y la formación de agregados. Los animales homocigotos para la inserción se desarrollan normalmente, son fértiles y el transgén activo se transmite a su descendencia en una proporción mendeliana. Los ratones heterocigotos expresan la proteína fluorescente roja a menor intensidad que los homocigotos. La expresión se observa en todas las etapas embrionarias y adultas y es muy alta en páncreas, músculo esquelético, corazón y vesícula seminal (Vintersten, Monetti et al. 2004).

DISECCIÓN Y HOMOGENIZACIÓN DE ORGANOS HEMATOPOYÉTICOS

Para la obtención de embriones a diferentes estadios de gestación se establecen los cruces y se revisa diariamente la aparición del tapón vaginal, designado como día cero de gestación (E0). Teniendo en cuenta el tapón vaginal, los embriones se obtienen entre los días E10-E14. Los órganos embrionarios hematopoyéticos fetales (el hígado fetal, la región de la aorta, gónadas y mesonefros (AGM), el saco vitelino y la placenta) son disecados en DPBS con Ca^{2+} y Mg^{2+} (del inglés: *Dulbecco's phosphate buffered saline*, D8662, Sigma-Aldrich) suplementado con 5% de FCS, suero fetal de ternera (del inglés: *fetal calf serum* defined transplant, SH3039603, Hyclone) y 1% de P/E, Penicilina/Estreptomicina (100x, PAA, P11-

010, The cell culture company) utilizando para ello una lupa Leica MZ 7.5 y jeringas de 1ml de 27G (301359, BD Plastipack). AGM, saco vitelino y placenta son tratados con 0,12% de colagenasa en DPBS 10%FCS durante 30-45 minutos a 37°C, agitando cada 10 minutos (Collagenase, C9407, Sigma-Aldrich; DPBS libre de Ca^{2+} y Mg^{2+} , D8537, Sigma-Aldrich) (1,5ml DPBS y 250 μl de colagenasa stock al 0,8%). El tubo se transfiere al hielo y se homogenizan los tejidos mediante pipeteo suave (unas 20-30 veces). Seguidamente se añade 6ml de DPBS con Ca^{2+} y Mg^{2+} , 5%FCS, 1%P/E y se centrifuga a 1200 rpm 5 minutos. Este proceso se repite dos veces. Entre cada lavado se pipetea las células para obtener una buena homogenización tisular. El hígado fetal, se disgrega mecánicamente mediante pipeteo suave. La suspensión celular de varios órganos se lleva a 5 ml y se filtra con una malla de nailon de 70 μm (352350 Cell Strainer, BD Falcon) (no se filtra en el caso del AGM). Las células se cuentan en el microscopio y se re-suspende en un volumen determinado dependiendo del experimento a realizar.

Los órganos hematopoyéticos adultos (médula ósea, el bazo y el timo) se recogen en DPBS sin Ca^{2+} y Mg^{2+} suplementado con 5%FCS y 1%P/E. La suspensión celular de médula ósea se obtiene haciendo pasar varias veces 1 ml de DPBS a presión con la jeringa de 27G por la cavidad del fémur y la tibia. Para homogeneizar el timo y el bazo se depositan en una placa Petri con 1ml de DPBS y se presiona sobre ellos con el émbolo de la jeringa. Seguidamente el tejido se homogeniza por pipeteo en un volumen de 5-10 ml de DPBS 5% FCS 1%P/E. Las células se filtran con una malla y se cuentan para su posterior análisis o trasplante.

TINCIÓN NBT PARA EMBRIONES SCL3'Enh-PLAP

Para poder seleccionar solo los órganos hematopoyéticos procedentes de embriones transgénicos generados en cruces entre ratones de la línea 1791 SCL3'Enh-PLAP, es necesario determinar previamente cuáles de los embriones son transgénicos. Para ello se detecta la expresión de PLAP mediante una reacción enzimática coloreada con el sustrato de la fosfatasa alcalina BCIP/NBT, denominada tinción NBT. Se toman partes del embrión que sean desechadas, como el saco vitelino o la cabeza, en 0.5 ml de PBS (0780, Amresco) y se incuban durante 30 minutos a 75°C, para inactivar la fosfatasa endógena. Después de enfriar durante 15 minutos a temperatura ambiente se retira el PBS y se añaden 0.5 ml de solución de lavado fosfatasa alcalina (0.1 M Tris-HCl a pH 9.5, 0.01 M MgCl_2 , 0.1 M NaCl en agua milli q, ver Apéndice). Se agitan e incuban 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación hay que retirar la solución de lavado para añadir la solución de tinción fosfatasa alcalina (0.1

M Tris-HCl a pH 9.5, 0.05 M $MgCl_2$, 0.1 M NaCl, y 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/nitroblue tetrazolium (BCIP/NBT) (1681451, Roche) en agua milli q, ver Apéndice). Se incuban 5 minutos y aquellos embriones que sean SCL-3'EnhPLAP positivos adquieren un color morado, mientras que los silvestres se quedan sin teñir. Seleccionamos solo los órganos hematopoyéticos de los transgénicos, pudiendo usar los silvestres como controles.

ANÁLISIS Y SEPARACIÓN CELULAR POR CITOMETRÍA DE FLUJO

Un máximo de 5×10^6 - 10×10^6 células se re-suspenden en 100 μ l de solución bloqueante (PBS 5% FCS, 20% GS, suero de cabra (del inglés *Goat Serum*, G6767, Sigma-Aldrich inactivado por calor) y 10% de sobrenadante que contiene bloqueante de receptores de inmoglobulinas (FC Block: sobrenadante del cultivo celular del hibridoma 2.4G2 con anticuerpo contra el receptor de inmunoglobulinas *Fc γ III/II Receptor, rat anti mouse CD16/CD32*)) y se incuban 30 minutos en hielo. Seguidamente se añaden los anticuerpos primarios (Tabla 2), se incuban 30 minutos en hielo y se lavan las células en PBS 5%FCS dos veces. La incubación con anticuerpos secundarios (Tabla 3) se realiza de la misma manera. Después de los lavados se re-suspende en PBS 5%FCS y se determina la intensidad de fluorescencia por el citómetro de flujo BD FACSAria Cell Sorter equipado con dos láseres: azul de 488nm y rojo de 633nm y el software FACSDiva.

Para el análisis por citometría de flujo de la actividad β -galactosidasa de una suspensión de células transgénicas SCL3'EnhLacZ se usa el sustrato FDG (del inglés *fluorescein di- β -D-galactopyranoside*, F2756-5mg, Sigma- Aldrich) (Sanchez, Gottgens et al. 1999), a una concentración final de 1mM. FDG es detectado en el FACSaria en el canal de FITC. Para preparar una solución stock 2mM FDG, se genera previamente una solución 50% de DMSO (*Dimethyl Sulfoxide*, 472301, Sigma-Aldrich) en agua para cultivos y de esta solución se añaden 36 μ l a los 5mg de FDG. Se re-suspende bien hasta quedar transparente. A continuación se añaden 3724 μ l de agua para cultivos, se mezcla, se divide en alícuotas y se congela. Para la tinción con FDG, una vez teñidas las células con anticuerpos se re-suspenden exactamente en 20 μ l de PBS, pre-incuban 5 minutos a 37°C y se mezcla bien con 20 μ l de solución 2mM FDG precalentada. A continuación se incuban 70 segundos a 37°C. Se traslada a hielo y la reacción se para añadiendo 400 μ l de PBS frío al 5% FCS y 0,5 μ g/ml de PI, Ioduro de Propidio (del inglés, *Propidium iodide*, 556463, BD Pharmingen). Se incuba durante 1 hora a 4°C y oscuridad antes de analizarlas en el citómetro.

Para la separación de poblaciones celulares por citometría de flujo, una vez teñida la suspensión celular, se re-suspenden en 2 ml de DPBS 5%FCS 1%P/E en presencia de 7AAD (7-*Aminoactinomycin-D*, A9400, Sigma-Aldrich) o PI para excluir las células muertas. Las células se pasan por el citómetro y se separan en base a la expresión del correspondiente fluorocromo. Las diferentes poblaciones celulares se recogen en DPBS con Ca^{2+} y Mg^{2+} al 50% FCS 1%P/E. La pureza de las poblaciones seleccionadas se encuentra entre el 90% y el 98%. Posteriormente se centrifugan a 1500rpm durante 5 minutos, se cuentan y re-suspenden en DPBS 1%FCS para ser trasplantadas o para su posterior análisis in vitro.

TABLA 2. Lista anticuerpos primarios usados en citometría de flujo.

Nombre (clon)	Concentración	Especie donde se genera	Nº de catálogo	Casa comercial
Anti-human Placental Alkaline Phosphatase (PLAP)	1:250	Conejo	AHP537	AbD; Serotec
Anti-mouse CD31 PE conjugated (MEC 13.3)	1:100	Rata	553373	BD Pharmingen
Anti-mouse CD34 Alexa Fluor 647 Conjugated (RAM34)	1:100	Rata	560230	BD Pharmingen
Anti-mouse CD34 PE conjugated (RAM34)	1:100	Rata	551387	BD Pharmingen
Anti-mouse CD44 PE conjugated (IM7)	1:100	Rata	553134	BD Pharmingen
Anti-mouse CD45 PE Conjugated (30-F11)	1:100	Rata	12-0451-82	eBioscience
Anti-mouse CD45 biotin Conjugated (30-F11)	1:100	Rata	553078	BD Pharmingen
Anti-mouse/ human CD45R (B220) PE Conjugated (RA3-6B2)	1:100	Rata	12-0452-82	eBioscience
Anti-mouse CD117 (c-Kit) PE Conjugated (2B8)	1:100	Rata	553355	BD Pharmingen
Anti-mouse CD144 (VE-cadherin)- Alexa Fluor 647 conjugated (BV13)	1:100	Rata	138005	BioLegend
Anti-mouse CD144 (VE-Cadherin) Biotin Conjugated (BV13)	1:100	Rata	13-1441-82	eBioscience
Anti-mouse F4/80 Alexa Fluor 488 conjugated	1:100	Rata	MF48020	Molecular Probes
Anti-mouse F4/80 purified	1:100	Rata	MF48000	Molecular Probes
Anti-mouse Flk-1 PE Conjugated (Avas 12alpha1)	1:100	Rata	555308	BD Pharmingen
Anti-mouse Ly-6A/e (Sca-1) PE Conjugated (E31-161.7)	1:100	Rata	01835B	BD Pharmingen
Anti-mouse Ter-119 PE Conjugated (TER-119)	1:100	Rata	12-5921-82	eBioscience
Anti-mouse Tie-2 Biotin Conjugated (TEK4)	1:100	Rata	13-5987-81	eBioscience

TABLA 3. Lista anticuerpos secundarios y soluciones para tinción usados en citometría de flujo.

Nombre	Concentración	Especie donde se genera	Nº de catálogo	Casa comercial
Alexa Fluo 488 anti- rabbit	1:500	Cabra	A11034	Molecular Probes
Alexa Fluor 647 anti- rabbit	1:500	Cabra	A21245	Molecular Probes
Streptavidin-FITC	1:500		554060	BD Pharmingen
Streptavidin-Phycoerythrin	1:500		13025D	BD Pharmingen
Cy5-Streptavidin	1:500		PA45001	GE Healthcare
7-Aminoactinomycin D (7AAD)	1:1000		A 9400	Sigma Aldrich
Propidium Iodide (PI)	1:1000		556463	BD Pharmingen
Fluorescein di(β-D-galactopyranoside) (FDG)	1:5		F2756	Sigma Aldrich

TRASPLANTES

Trasplante en ratones adultos irradiados

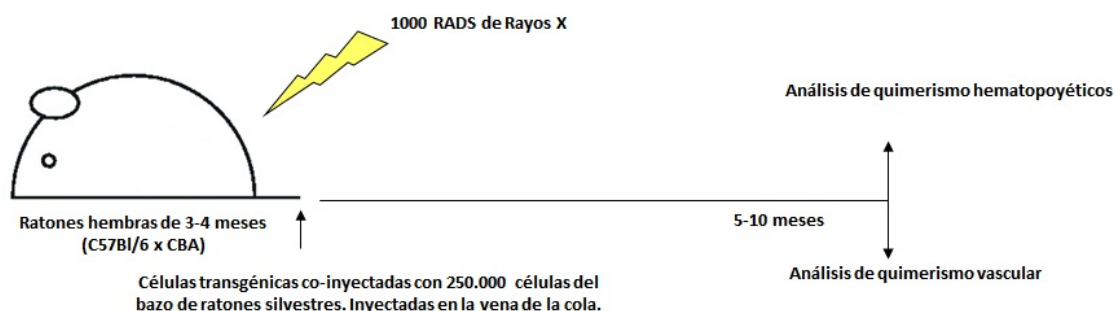
Ratones Irradiados hembras (C57Bl/6 x CBA) de entre tres y cuatro meses de edad son expuestas a una dosis de 500 + 500 RADS de rayos X (CP-60, FAXITROM, Canada) o una fuente Cs (Cambridge Biomedical Services) con dos horas de diferencia entre dosis como previamente se describió (Sanchez, Bockamp et al. 2001). Las células transgénicas son co-inyectadas con 250.000 células de bazo de ratones no transgénicos para proporcionar protección de la irradiación letal. Las células se re-suspenden en 300µl de DPBS 1%FCS y se inyectan en la vena de la cola (Figura 14A).

Trasplante en ratones recién nacidos tratados con busulfán

Seguimos un protocolo previamente publicado (Dekel, Metsuyanin et al. 2008) basado en el método descrito por Yoder y con algunas modificaciones (Yoder, Cumming et al. 1996). El busulfán (B-2635, Sigma-Aldrich) se prepara a 1mg/ml re-suspendiendo mediante agitación, 12.5mg de busulfán en 250 µl DMSO. Una vez resuspendido se añaden 12.5 ml de DPBS pre-calentado a 50°C y se mantiene a esta temperatura hasta su administración. Las hembras embarazadas se inyectan a día 17 y 18 de gestación intra peritonealmente con una dosis de busulfán de 15mg/kg. Los ratones receptores nacen a día 19 y las células donantes se transfieren al día siguiente en la vena facial en una suspensión de 50µl de DPBS1%FCS según el protocolo descrito (Sands and Barker 1999) (Figura 14B).

Una vez trasplantados los animales se analizan a diferentes tiempos y se determina la contribución hematopoyética y vascular. Se considera que el injerto es estable y potencialmente funcional, cuando la señal se mantiene más de 4 meses post-trasplante (en inglés *Long Term Reconstitution Assay (LTRA)*). La selección de los animales trasplantados es, en general, por su quimerismo hematopoyético a partir de las 4 semanas post trasplante. Esta selección se realiza mediante determinación del marcador donante en sangre periférica.

A. TRASPLANTE EN ADULTOS IRRADIADOS



B. TRASPLANTE EN RECIÉN NACIDOS TRATADOS CON BUSULFÁN

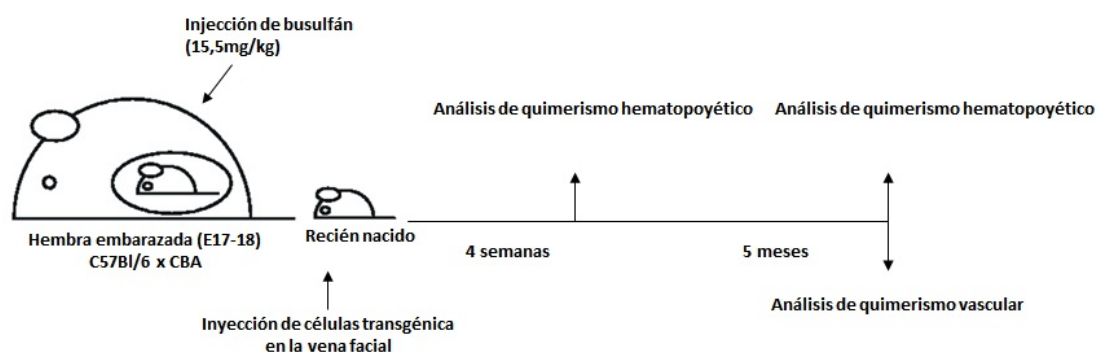


FIGURA 14. Protocolo de trasplante en ratones adultos irradiados y ratones recién nacidos tratados con busulfán.

A. Ratones Irradiados hembras (C57Bl/6 x CBA) de entre tres y cuatro meses de edad son expuestas a una dosis de 1000 RADS. Las células transgénicas son co-inyectadas con 250.000 células de bazo de ratones no transgénicos para proporcionar protección de la irradiación letal. Las células re-suspendidas en 300µl de D-PBS son inyectadas en la vena de la cola. B. En trasplantes en ratones recién nacidos tratados con busulfán, las hembras embarazadas se inyectan intra peritonealmente con una dosis de busulfán de 15mg/kg a día 17 y 18 de gestación, los ratones receptores nacen a día 19 y las células donantes se transfieren al día siguiente en la vena facial en una suspensión de 50µl de D-PBS1%FCS. Al mes del trasplante se obtiene sangre para realizar análisis de quimerismo hematopoyético por PCR y Facs. Entre 5-10 meses los animales son sacrificados para análisis de injerto vascular y hematopoyéticos.

ANÁLISIS DE INJERTO HEMATOPOYÉTICO

A corto plazo (al mes del trasplante):

El injerto hematopoyético a corto plazo se determina por detección en sangre periférica del marcador genético de las células donantes (PLAP, RFP, LacZ ó Y) mediante PCR con oligonucleótidos específicos usando miogenina (Myo) como control endógeno.

- **Sangrado de animales**

Para la obtención de sangre periférica, previamente se induce vasodilatación mediante la exposición de los animales a una lámpara térmica de 250W durante 10 minutos. A continuación, se frota con etanol la zona de la cola donde se realiza una pequeña incisión en la vena lateral y se recogen entre 7-10 gotas de sangre en un eppendorf conteniendo 500 µl de *tail buffer* (0.05 M TRIS pH 8, 0,1 M EDTA, 0.1 M NaCl, 1% SDS en agua milli-q estéril, ver Apéndice). Seguidamente, se añaden 10µl de proteinasa kinasa (PK) (20mg/ml, P-6556, Sigma- Aldrich), se mezcla e incuba en el termo-bloque a 56°C toda la noche para proceder a su posterior extracción de ADN mediante un protocolo de fenol cloroformo.

- **Extracción de ADN con fenol cloroformo**

Para la obtención de DNA genómico de la sangre, se realizan dos pasos de extracción con fenol/cloroformo (*Phenol Solution*, p4557-400ml, Sigma-Aldrich; *Cloroformo*, 1.02445.1000, Merck). Para ello se añaden volúmenes equivalentes de fenol/cloroformo a los eppendorf, se agitan y se centrifugan a 13.000 rpm durante 15 minutos. Seguidamente se añade isopropanol (20842.298, Prolabo) al sobrenadante (50µl menos del volumen de sobrenadante) y se mezcla por inversión para hacer precipitar el ADN. Se vuelve a centrifugar y se retira el sobrenadante para lavar el pellet con etanol al 70%. Se centrifuga y se retira el sobrenadante en su totalidad. El pellet se re-suspende en 50µl de TE (Tris EDTA, 10 mM de Tris-ClH pH 8 y 1 mM de EDTA pH 8.0 en agua destilada estéril, ver Apéndice), de donde se recogen 2 µl para cada reacción de PCR que se realice.

- PCR para PLAP, LacZ, RFP y Myo

Las reacciones de PCR para cada marcador se realizan en un volumen final de 25 µl. Las condiciones de tiempo y temperatura, así como la concentración de cada reactivo, y los diferentes oligonucleótidos empleados se especifican en la tabla 4, 5 y 6.

TABLA 4. Condiciones de tiempo y temperatura para la PCR

Paso	Tiempo	Temperatura	
1: Desnaturalización	5 minutos	95°C	
2: Desnaturalización	10 segundos	95°C	X 34
3: Unión de cebadores	30 segundos	65°C	
4: Amplificación	60 segundos	65°C	
5	10 minutos	72°C	
6	∞	4°C	

TABLA 5. Mezcla para cada muestra de PCR

Mezcla para cada reacción (2µl de muestra) +	Tipo de PCR				
	PLAP (µl)	LacZ (µl)	RFP (µl)	Y (µl)	Myo (µl)
Agua mili q	15.3	15.3	13.4	15.3	12.3
Buffer 10x	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
MgCl ₂ (25 mM)	2	2	2	2	2
dNTP's (5mM)	1	1	1	1	1
Oligonucleótido 1	1 PLAPf	1 L1	3 Rfp1	1 Y1	2.5 M1
(concentración)	(10µM)	(100 ng/µl)	(10 µM)	(100ng/ul)	(50 ng/ µl)
Oligonucleótido 2	1 PLAPr	1 L2	1 Rfp2	1 Y2	2.5 M2
(concentración)	(10µM)	(100 ng/ µl)	(10 µM)	(100ng/ul)	(50 ng/µl)
Taq polimerasa (5U/µl)	0.2	0.2	0.1	0.2	0.2

TABLA 6: Oligonucleótidos empleados

Denominación	Secuencia	Tamaño
PLAP		
<u>PLAP f (pAp3f):</u>	GAC TGA GCC CAT GAC ACC AA	375 pb
<u>PLAPr (pAp3r)</u>	TGG ACA AAC CAC AAC TAG AAT GC	
LacZ		
<u>L1:</u>	GCG ACT TCC AGT TCA ACA TC	500 pb
<u>L2:</u>	GAT GAG TTT GGA CAA ACC AC	
RFP		
<u>Rfp1:</u>	CCC CGT AAT GCA GAA GAA GA	208 pb
<u>Rfp2:</u>	GGT GAT GTC CAG CTT GGA GT	
Y		
<u>Y1:</u>	TCA TGA GAC TGC CAA CAA CAG	440 pb
<u>Y2:</u>	CAT GAC CAC CAC CAC CAC CAA	
Miogenina (Myo)		
<u>M1:</u>	TTA CGT CCA TCG TGG ACA GC	440 pb
<u>M2:</u>	TGG GCT GGG TGT TAG TCT TA	

Las muestras se corren en gel de agarosa (50005, Cambrex Bio Science) al 1% preparado a partir de la solución TBE 0,5x (Tris Borato EDTA: Tris-borato 45mM, EDTA 1mM, ver Apéndice).

A largo plazo (a los 5 meses del trasplante):

El injerto hematopoyético a largo plazo se determina por cuantificación de células donantes (PLAP+, RFP+ o LacZ+) por citometría de flujo en sangre periférica. También se determina por PCR semicuantitativa de marcadores genéticos en sangre periférica, bazo, médula ósea, nódulos linfáticos y timo.

- **Análisis de sangre por citometría de flujo: lisis de eritrocitos**

Entre 7-10 gotas de sangre se recogen en tubos de citometría conteniendo 2 ml de PBS / EDTA (80 ml PBS + 1,6 ml EDTA 0.5M, ver Apéndice) en hielo. Seguidamente se centrifuga a 1100rpm durante 5 minutos a 4°C, se aspira el sobrenadante y los tubos se transfieren a un baño a 37°C. Las células se re-suspenden en 2ml de solución de lisis de eritrocitos precalentada (0,14M NH₄Cl y 0,017M Tris, pH 7,2, ver Apéndice) y se incuba durante 5 minutos a 37°C. Posteriormente se centrifuga y se repite la lisis si el pellet es rojo. Lavar las muestras con 3ml de PBS al 5% de FCS y proceder a la tinción con anticuerpos anti-PLAP y

CD45 para análisis por FACS. En algunos casos se determina directamente la proteína RFP/CD45 o LacZ por tinción con FDG.

- PCR semicuantitativa

El ADN genómico se extrae de $5-50 \times 10^6$ células obtenidas de diferentes órganos (bazo, médula y timo). Entre 50 y 100 μ l de suspensión celular se incuban toda la noche con 5 μ l de PK en 750 μ l de Tail Buffer, a 58°C. Los nódulos linfáticos y la sangre se tratan con PK directamente, sin homogeneizar. Seguidamente se agitan los tubos durante 10 minutos, se añaden 250 μ l de NaCl 5M (ver Apéndice) y se vuelve a agitar 10 minutos más. Se centrifuga a 13000rpm 10 minutos, se retiran 750 μ l del sobrenadante y se mezclan con 500 μ l de isopropanol. Se centrifuga y se descarta el sobrenadante. Lavar dos veces el pellet con 500 μ l de etanol al 70% y centrifugar. Retirar todo el etanol posible y re-suspender en 50 μ l de TE (10 mM de Tris-ClH pH 8 y 1 mM de EDTA pH 8.0 en agua destilada estéril, ver Apéndice).

La concentración de ADN se mide en el Nanodrop, y se igualan a 40ng/ μ l. Para generar la escalera de diferentes concentraciones del marcador, se realizan diluciones seriadas de ADN genómico obtenido de un ratón transgénico con la suspensión de ADN genómico de un ratón no transgénico. Se realizan diluciones al 100%, 10%, 1%, 0.1% y 0% de ADN genómico del transgénico. Todas ellas a una concentración de 40ng/ μ l. El producto de PCR para los diferentes marcadores se corre en un gel de agarosa y se cuantifica la intensidad de bromuro de etidio para la banda específica y la del control endógeno miogenina. Para la cuantificación se emplea el software del Typhoon9410 o se toma una foto del gel, se escanea y se analiza mediante el software de análisis Gel-Pro Analyzer. Valores normalizados se integran en la curva obtenida con la escalera de diluciones y mediante comparación de intensidad en el programa se estima el porcentaje de contribución hematopoyética de cada órgano (Muller and Dzierzak 1993; Sanchez, Holmes et al. 1996; Silberstein, Sanchez et al. 2005).

ANÁLISIS DE INJERTO VASCULAR

Procesado de los órganos y generación de secciones histológicas

El animal es perfundido previamente a la disección de los diferentes órganos. Para ello, después de suministrar la anestesia (20% xilacina/ 8% ketamina en agua destilada estéril: Ketamina (Ketolar50mg/ml de Pfizer) Xilacina (20mg/ml)(Rompun de Bayer)) se introduce una cánula en el ventrículo izquierdo y se perfora la aurícula para dejar pasar 20-40 ml de TBS (Tris Buffered Saline: 0.05M Tris Base, 0.9% NaCl, pH 7,6, ver Apéndice) con 0,001% heparina (ROVI 1% REF : 768200) a una velocidad media de 17ml/minuto. Se extraen los órganos y se transfieren a 10-20 ml de fijador Zinc (550523, BD Biosciences). A continuación se cortan con un grosor de entre 3-6mm y se incuban en el fijador durante 18-24 horas a temperatura ambiente con agitación suave (Hicks, Johnson et al. 2006). Después de fijar se deshidratan mediante incubaciones en concentraciones ascendentes de etanol, xileno (1.08681.1000, Merck) y finalmente se incluyen en parafina Histosec a 60°C (111609.2504, Merck, Germany). (70% Etanol 30 minutos; 90% Etanol 30 minutos; 100% Etanol 30 minutos (4 veces); Xileno 20 minutos (3 veces); parafina 20 minutos (2 veces)).

Normalmente se generan 4 bloques por hígado (6-8 trozos), dos bloques de riñón, un bloque de corazón y un bloque de pulmón. Las secciones de 5-6 µm se realizan con un micrótopo Leica RM 2145 y se ponen en portas Star Frost Plus (A100018, Deltalab). Para determinar la extensión de repoblación vascular en los diferentes órganos, se toman secciones no seriadas, desechando 15-20µm de tejido (3-4 secciones) entre una sección y otra. Antes de teñir las secciones se elimina la parafina por incubación en Histoclear (NeoClear, 1.09843.5000, Merck) seguido de rehidratación en concentraciones descendentes de etanol, después agua y PBS, todo en agitación a temperatura ambiente. (Histoclear 15 minutos (2 veces); 100% Etanol 3 minutos (2 veces); 90% Etanol 3 minutos; 70% Etanol 3 minutos; H₂O_d 3 minutos; PBS 5 minutos).

Tinción NBT en secciones

Para detectar la expresión de PLAP en secciones mediante una tinción histoquímica, se emplea la reacción coloreada de la fosfatasa alcalina con el sustrato nitroblue tetrazolium (NBT) como se ha indicado en apartados anteriores para tinción de embriones, con modificaciones (Silberstein, Sanchez et al. 2005). Se procede a la inhibición de la fosfatasa

endógena mediante la incubación de las secciones en PBS precalentado a 75°C durante 35 minutos. Después se lava durante 15 minutos en solución de lavado fosfatasa alcalina (0.1 M Tris-HCl a pH 9.5, 0.01 M MgCl₂, 0.1 M NaCl en agua milli q, ver Apéndice), y se transfieren los portas a la solución de tinción fosfatasa alcalina (0.1 M Tris-HCl a pH 9.5, 0.05 M MgCl₂, 0.1 M NaCl, y 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/nitroblue tetrazolium (BCIP/NBT) en agua milli q, ver Apéndice). Las secciones se incuban en oscuridad a temperatura ambiente durante 1 hora. A continuación se retira el sustrato mediante lavado en agua y se incuba con solución de contraste brasilina o neutral red (Anachem, Bedfordshire, U.K., <http://www.anachem.co.uk>). Las secciones se deshidratan (30% Etanol 1 minuto; 70% Etanol 1 minuto; 90% Etanol 1 minuto; 100% Etanol 1 minuto (2 veces); Histoclear 5 minutos (2 veces)) y se montan en medio de montaje DPX (360294H, Merck).

Cuantificación señal dispersa NBT positiva por fraccionamiento de colores “threshold method”

Para cuantificar la contribución de células donantes PLAP+ a los diferentes órganos analizados mediante tinción por NBT se emplea el software de análisis de imagen AnalSYS v3.1.110 (Soft Imagen System GmbH, www.soft-imaging.net). La distribución de las células donantes PLAP+ en los órganos de los ratones quiméricos se agrupan en las siguientes categorías: 1- señal dispersa, células individuales PLAP+ distribuidas por toda la sección; 2- señal dispersa, alrededor de vasos medianos y grandes. 3- señal de parche, células asociadas PLAP+ formando una red microvascular.

La señal dispersa NBT positiva (asociada y no asociada a vasos medianos) se cuantificó mediante el método de fraccionamiento de colores puesto a punto en el laboratorio. Para ello, se toman fotos aleatorias de 5 secciones no seriadas de cada bloque de parafina. Se toman 5 fotos por sección (total 25 fotos) con un aumento de 400x, que corresponden a 0.25mm de muestra por foto. La toma de imágenes se realiza con el microscopio óptico (Leica DM5000B) conectado a una cámara digital (Leica DC-180). Cada imagen contiene 778 píxeles. Se emplea el programa de adquisición de imágenes IM50 (Leica).

Para el análisis de las fotos se usa el programa: AnalSYS v3.1.110 (Soft Imagen System GmbH, www.soft-imaging.net). Para que cada pixel de la imagen corresponda con un mm de muestra hay que modificar los parámetros de aumento en el programa. Para ello se selecciona de la barra de herramientas: *Image - Set Magnification*, y se pone el valor de 3000 píxeles/mm, que se calcula dividiendo el número de píxeles de la imagen (778) entre

los 0.25mm de muestra que abarcan las fotos (Tabla 7). Para dibujar la escala en la imagen en la barra de herramientas hay que seleccionar: *Image- Scale Bar- Draw into overlay*. Crear una base de datos con las fotos de la sección modificadas para el mismo aumento.

Para el análisis usar un icono de la barra de herramientas: *Set Color Threshold*, con el que se ajustan los valores RGB de cada pixel para que el programa tome los diferentes colores que ofrece la foto. El rango de colores de cada área segmentada está definido por una combinación de canales de colores RGB denominado Phase PLAP (células teñidas por NBT, representado en verde), Phase Tissue (tejido negativo para PLAP y teñido por brasilina, representado en azul) y Phase Empty (zona sin tejido, representada en amarillo). (Figura 15 A, B, C). Seleccionar los valores Thresholds manualmente para cada serie de tinciones.

El porcentaje de señal dispersa PLAP+ de cada una de las 25 fotos se miden con el icono de la barra de herramientas: *Measure – Phase Analysis*. Las áreas segmentadas se miden de forma automática en cada imagen y los resultados se expresan en porcentaje del área total como se muestra en la tabla de cálculo de la figura 15D. Para obtener la estadística seleccionar: *Measure – Statistics*. El porcentaje de área de tejido NBT⁺ es calculado como $100 \times (\text{medida del área de NBT}^+ / (\text{medida del área de NBT}^+ + \text{medida del área de NBT}^-))$. El procedimiento de tinción y cuantificación se realiza al menos dos veces por cada tejido NBT⁺.

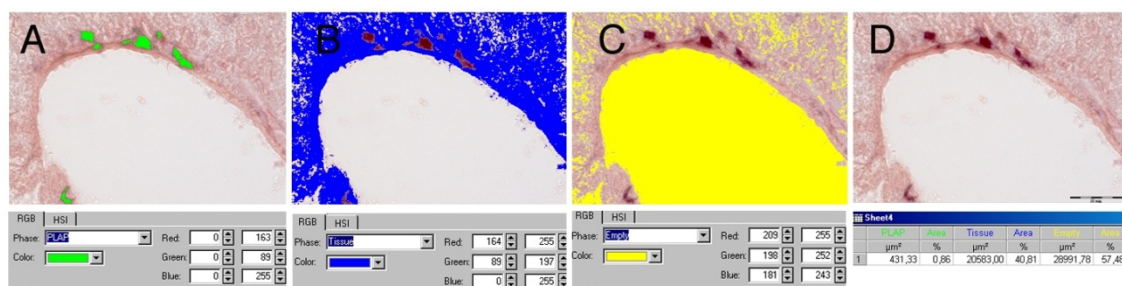


FIGURA 15. Cuantificación de la señal NBT dispersa.

Pantalla representativa del software de Analysis que permite segmentar el área de tejido en colores (señal PLAP+ en verde; tejido total en azul; vacío en amarillo) y calcular la señal positiva de la imagen en RGB usando el método Threshold. Una imagen de una sección de hígado de quimera de hígado fetal teñida para NBT esta mostrada. Se necesitan 25 fotos con un aumento de 400x tomadas al azar. A. El área de señal NBT+ es coloreada en verde. B. El área de tejido negativo es coloreado en azul. C. El área de espacio vacío es coloreado en amarillo. D. Imagen no coloreada. A.B.C Presentan: un cuadro de diálogo con los valores numéricos representativos para RGB. D Imagen sin colorear, presenta un cuadro de resultados expresados en μm^2 y porcentaje de cada una de las áreas segmentadas.

La cuantificación de la señal dispersa no permite discriminar entre las células que forman parte de los vasos de mediano calibre (espacios portales hepáticos) y la no asociada a vasculatura.

Para determinar la asociación a espacios portales, en algunas muestras se ha contabilizado la frecuencia de espacios portales que presentan señal NBT (como mínimo tienen que presentar 3 células). El número mínimo de espacios portales cuantificados es de 200 por animal. La cuantificación de las mismas se realiza cuantificando el número de vasos sanguíneos con células PLAP+ a su alrededor respecto del total de vasos sanguíneos de mediano calibre por el que está compuesta cada sección, y se representa en porcentaje de vasos con células PLAP+.

Cuantificación del número y área relativa de parches PLAP+ por acotamiento zonal

Para cuantificar el número y extensión de área relativa de parches vasculares se empleó la aplicación de cuantificación por el método de acotamiento zonal de área.

Para realizar la cuantificación de los parches se toman imágenes con el aumento de 25x y de 100x en el microscopio óptico de luz (Leica DM5000B) conectado a la cámara digital (Leica DC-180) usando el programa de adquisición de imágenes IM50 (Leica) (Figura 16C). La cuantificación de área se realiza sobre fotos tomadas a un aumento de 200x. Cada foto se carga y analiza con el software AnaliSYS ejecutando la siguiente ruta: a) *Image - Set Magnification*- Cambiar los parámetros para fotos tomadas con un aumento de 200x, poner el valor de 1555 pixeles/mm, calculado a partir de la división de 778 pixeles de la imagen entre 0.5mm de muestra (Tabla 7); b) *Image- Scale Bar- Draw into overlay* - Dibujar la escala en la imagen; c) *Measure – Arbitrary Area* – Dibujar a mano el contorno del parche. El valor del área en mm² se indica automáticamente en un documento Excel (Figura 16D). Este proceso se repite para cada parche. Definimos un parche NBT+ (compuesto por células PLAP+) cuando aparece una señal continua distribuida en un área > 0.01mm².

Dos procedimientos se siguieron para estimar el número de parches:

a) Estimación respecto al número de secciones observadas.

Los valores relativos asignados eran los siguientes: +++ (alta frecuencia), cuando al menos un parche NBT+ era detectado en cada 5-10 secciones; ++ (baja frecuencia), cuando al menos un parche era detectado en cada 10-20 secciones; + (muy baja frecuencia), cuando un parche era detectado al menos una vez; -, cuando no se observaba ningún parche.

Para realizar una cuantificación más exacta se determinó el área de parches y el número de parches respecto al área total de tejido analizado, y no por secciones.

b) Estimación respecto al área total de tejido analizado.

Para calcular el área total de tejido analizado se toman fotos de cada sección en la lupa Leica MZ 7.5 conectada a una cámara digital Nikon que adquiere imágenes con 640 pixeles (Figura 16A). Las fotos se toman al aumento de 6.3x que corresponden a 16 mm de muestra (Tabla 7). Las imágenes se cargan en el software de Análisis v3.1.110 para 40 pixeles/mm, se determinan las áreas de los diferentes trozos de tejido que forman la sección como se indica en el apartado anterior. El área por sección es la suma de áreas por fragmento de tejido (Figura 16B). El área total analizada es la suma del área de cada sección. Si hay varios bloques por quimera, se suman estos valores para obtener el total de área analizada por quimera.

Una vez determinada el área total analizada, se determina el número y área de parches NBT+. Los valores de frecuencia son referidos a cm^2 . Los valores finales se calculan como media de valores para cada quimera.

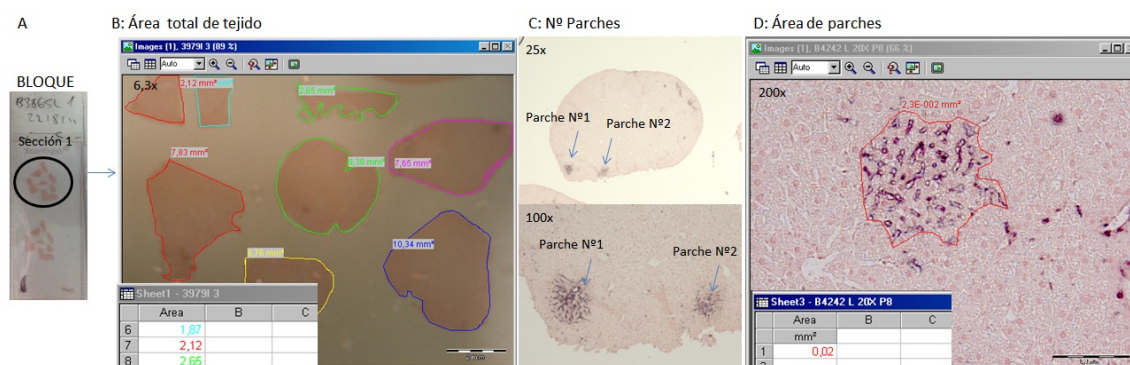


FIGURA 16. Cuantificación por acotamiento zonal del N° y área relativa de parches PLAP+/ cm^2 de tejido analizado.

A. Porta con dos secciones no seriadas del mismo un bloque de hígado. B. Imagen de una sección adquirida a un aumento de 6.5x mostrando la cuantificación del área de cada uno de los trozos de tejido que forman la sección. La suma de estos valores nos da el área total de la sección. C. Dos fotos tomadas a un aumento de 25x y 100x con las que se puede visualizar el número de parches presentes en un trozo de tejido. D. Pantalla representativa del software de Análisis donde se cuantifica el área de un parche en una foto con un aumento 200x.

TABLA 7. Valores para el programa analiSYS.

Aumento	mm	píxeles	Aumento (pixel/mm)
6.25	16	640	40
100	1	778	778
200	0.5	778	1555
400	0.25	778	3000

Para que cada píxel de la imagen corresponda con un milímetro de muestra debido a la diferencia de píxeles que tiene el monitor de la lupa Leica MZ 7.5 conectada a una cámara digital Nikon (en el caso del aumento 6.25x) o del microscopio óptico de luz (Leica DMS000B) conectado a la cámara digital (Leica DC-180) (en el caso del aumento 100x, 200x y 400x) respecto a la pantalla del ordenador.

Inmuno-fluorescencia en secciones

Para la detección de la expresión de diferentes antígenos en secciones de tejidos en parafina, las secciones se incuban con solución de bloqueante (PBS 20% GS, 5% FCS), durante 90 minutos a temperatura ambiente. A continuación se añaden los anticuerpos primarios diluidos en solución bloqueante (Tabla 8), se cubre con papel para-film y se incuban en cámara húmeda toda la noche a 4°C. Después de 3 lavados en PBS 10 min, se añaden los anticuerpos secundarios (Tabla 9) también diluidos en solución de bloqueante, 90 minutos en la cámara húmeda a temperatura ambiente. Posteriormente se lavan en PBS tres veces, se montan con medio de montaje (S3025, Dako Faramount Aqueous) que contiene DAPI (4,6 diamidino-2-phenylindole) (H-1200, Vectashield, Vector, CA) diluido 0.5µl/ml.

Hay ciertas variaciones según el tipo de tinción:

- Cuando se realiza tinción con PLAP, CD31 y CD45, hay un paso intermedio de fijación en Paraformaldehído 4% (1.00496.5000, Merck) ya que hay dos anticuerpos de la misma especie y con esta fijación se facilita la unión permanente del anticuerpo secundario. Después del bloqueante se incuban los anticuerpos primarios PLAP y CD31, 4°C toda la noche, se lavan y se incuban los secundarios correspondientes (A568 α-rabbit y A488 α-rat). Se vuelve a lavar y el tejido se fija con Paraformaldehído 4% durante 8 minutos. Se lava en PBS y ahora se incuba con el anticuerpo primario CD45- biotinilado y posteriormente Estreptavidina-A647 o Estreptavidina- Cy5.
- Cuando se realiza tinción con PLAP, CD45 o F4/80 e Isolectina B4- biotina, se requiere un paso intermedio de incubación con PBlec (1% Triton 100x, 0,1mM CaCl₂, 0,1mM MgCl₂ y 0,1mM MnCl₂ en PBS pH 6,8, ver Apéndice). Primero se incuba el

tejido con los anticuerpos primarios PLAP y CD45 o F4/80 toda la noche a 4°C, y los secundarios correspondientes (A568α-rabbit y A488α-rat) 90 minutos a temperatura ambiente, se lavan en PBS y se incuban durante 30 minutos en la solución de PBlec. Posteriormente se añade la Isolectina B4- biotina (Gerhardt, Golding et al. 2003) diluida en PBT: PBS (0.25% Triton 100x, 0,5% FCS, ver Apéndice) y se incuba toda la noche a 4°C. Después de lavar con PBS y se añade Estreptavidina- Cy5 durante 4 horas a temperatura ambiente.

- En el caso de la tinción con PLAP, CD45 y anti actina del músculo liso conjugada con Cy3 (anti α smooth muscle actin Cy3 conjugated), primero se incuba el anticuerpo primario PLAP y CD45, después los secundarios A488α-rabbit y A647 α-rat, se lava en PBS y posteriormente se incuba el anticuerpo conjugado con Cy3.
- Cuando se realiza una tinción con cuatro anticuerpos, dos de ellos tienen que ir en el mismo color. Es el caso de la tinción con PLAP, CD34, CD45-biotina e Isolectina-biotina, CD45 e Isolectina van en azul. Primero se incuban los anticuerpos primarios contra PLAP y CD34, y después los secundarios correspondientes A568α-rabbit, A488 α-rat. Se vuelve a lavar y el tejido se fija con Paraformaldehído 4% durante 8 minutos. Se lava en PBS y ahora se incuba con el anticuerpo primario CD45-biotina. Se lava en PBS y ahora se incuba durante 30 minutos en la solución de PBlec. Posteriormente se añade la Isolectina B4 biotina diluida en PBT: PBS (0.25% Triton 100x, 0,5% FCS) y se incuba toda la noche a 4°C. Después de lavar se añade estreptavidina- Cy5 durante 4 horas a temperatura ambiente.

Siempre dejamos controles negativos incubados solo con la solución de bloqueante y con todos los anticuerpos secundarios usados.

Las imágenes se adquieren con el microscopio confocal Leica DM2500/TCS SPE usando el software LAS AD equipado con los laser 488, 532 y 635 y con el sistema Delta Vision con un microscopio Olympus IX-71 (Applied Precision; Issaquah, WA).

TABLA 8. Lista anticuerpos y reactivos primarios usados en inmuno-fluorescencia.

Nombre (clon)	Concentración	Especie donde se genera	Nº de catálogo	Casa comercial
Anti-human Placental Alkaline Phosphatase (PLAP)	1:20	Conejo	AHP537	AbD; Serotec
Anti-mouse CD31 purified (MEC13.3)	1:100	Rata	557355	BD Pharmingen
Anti-mouse CD31-biotin conjugated (MEC13.3)	1:100	Rata	553371	BD Pharmingen
Anti-Mouse CD34 purified (RAM34)	1:20	Rata	553731	BD Pharmingen
Anti-mouse CD45 biotin Conjugated (30-F11)	1:100	Rata	553078	BD Pharmingen
Anti-Mouse CD45 purified (30-F11)	1:100	Rata	553076 553077	BD Pharmingen
Anti-Mouse F4/80 purified (BM8)	1:100	Rata	MF48000	Molecular Probes
anti α smooth muscle actin Cy3 conjugated (1A4)	1:100		C 6198	Sigma- Aldrich
Lectin from <i>Bandeiraea simplicifolia</i> BS-I Isolectin B4 biotin Conjugate	1:50		L2140 (20 μ g/ml)	Sigma- Aldrich

TABLA 9. Lista anticuerpos y reactivos secundarios usados en inmuno-fluorescencia.

Nombre	Concentración	Especie donde se genera	Nº de catálogo	Casa comercial
Alexa Fluo 488 anti- rabbit	1:500	Cabra	A11034	Molecular Probes
Alexa Fluo 568 anti- rabbit	1:500	Cabra	A11036	Molecular Probes
Alexa Fluor 647 anti- rabbit	1:500	Cabra	A21245	Molecular Probes
Anti-rabbit biotin conjugated	1:200	Oveja	170304	AbD; Serotec
Alexa Fluo 488 anti- rat	1:500	Cabra	A11006	Molecular Probes
Alexa Fluo 568 anti- rat	1:500	Cabra	A11077	Molecular Probes
Alexa Fluor 647 anti- rat	1:500	Cabra	A21247	Molecular Probes
Alexa Fluo 647-Streptavidin	1:500		S-21374	Molecular Probes
Cy5-Streptavidin	1:100		PA45001	GE Healthcare

ANÁLISIS DE RIÑÓN ADULTO

Homogenización de riñón

Los riñones sin perfundir se recogen en DPBS sin Ca^{2+} y Mg^{2+} suplementado con 5%FCS y 1%P/E. Una vez eliminada la capsula renal, se corta y presiona con el émbolo de una jeringa. El homogeneizado se lleva a un volumen de 5 ml de DPBS conteniendo colagenasa a una dilución final de 0.8%. Las muestras se incuban durante 30 minutos a 37°C en agitación. La colagenasa se inactiva con el mismo volumen de medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, 41966-029, Gibco) al 10% de FCS y 1% de P/E, se disgregan mecánicamente mediante pipeteo suave y se centrifuga durante 10 minutos a 1100 rpm. El pellet de células se lava re-suspendiendo en DPBS al 5%de FCS y 1%P/E y se vuelven a centrifugar. Las células se filtran con una malla de nylon de 70µm y se cuentan para su posterior análisis o trasplante.

Ensayo de formación de colonias para progenitores hematopoyéticos

Para analizar la capacidad de formar colonias hematopoyéticas de células progenitoras fraccionadas para PLAP+ y PLAP-, así como las no fraccionadas de riñón y médula ósea procedentes de quimeras trasplantadas con células de hígado fetal se cultivan en medio semisolido Methocult (GF-M3434, Stem Cell Technologies Inc. Vancouver, Canada) para la formación de colonias mieloides y eritroides. Se incuban a 37°C en una atmósfera húmeda al 5% de CO_2 durante 7-14 días.

Después de la homogenización del riñón y de la médula ósea en DPBS al 5%de FCS y 1%P/E, las células se centrifugan y se ajusta la concentración celular a un máximo de 10^4 células en 100µl con medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium 41966-029, Gibco). Un volumen de 100µl de células se mezcla con 2ml de Methocult (descongelado y bien mezclado) en el vortex y se deja reposar 10 minutos para eliminar las burbujas. Con una jeringuilla se deposita el volumen en placas de 6 pocillos. Después de 7-14 días se fotografían las colonias obtenidas, para comparar según su morfología. Para determinar su genotipo se recogen las colonias, se extrae el ADN y por PCR se analiza si las colonias proceden de un progenitor que expresa el marcador PLAP.

HIBRIDACIÓN IN SITU PARA DETECTAR EL CROMOSOMA Y (Y-FISH)

La hibridación in situ es una técnica experimental basada en la capacidad que poseen los ácidos nucleicos para unirse (hibridarse) entre sí, mediante el reconocimiento de secuencias complementarias. Esta capacidad puede emplearse para identificar la presencia de una determinada secuencia de ácidos nucleicos en una muestra, por medio de la utilización de una sonda (secuencia de ácidos nucleicos de una sola cadena) complementaria marcada. Así, se produce la hibridación de la sonda marcada con la secuencia a buscar (en el caso de estar presente en la muestra), que se visualiza mediante técnicas específicas, en nuestro caso inmuno-fluorescencia. La hibridación in situ se caracteriza por presentar una especificidad muy elevada. Para identificar células de macho en un tejido de hembra, se utiliza una sonda específica para la región del cromosoma Y. Esta sonda fue cedida por el Dr. Manuel Dolado.

La sonda de ARN denominada pY3531B (Bishop, Boursot et al. 1985), reconoce una secuencia repetida del cromosoma Y de ratón. Se genera en el laboratorio del Dr. Manuel Dolado, a partir de un vector pBluescript II KS. Hasta la utilización de la sonda, se realizan varios procesos para su síntesis entre los que se encuentran la amplificación del vector en bacterias competentes, purificación del vector amplificado y extracción de la sonda mediante PCR. El producto amplificado se usa como molde para la síntesis de la sonda marcada con digoxigenina (DIG). La digoxigenina, molécula con la se lleva a cabo el marcado de la sonda, es una molécula de naturaleza esteroidea, presente únicamente en plantas del género *Digitalis*, por lo que su reconocimiento e identificación en tejidos de ratón no va a presentar problemas de especificidad. El proceso de transcripción y marcado con DIG se lleva a cabo utilizando el kit comercial "DIG RNA LABELING KIT (SP6/T7)" (Roche Applied Science).

El análisis Y-FISH se realiza en secciones de hígado fijadas en zinc y embebidos en parafina de ratones receptores hembra que presentaban alto nivel de quimerismo hematopoyético macho usando el siguiente protocolo. Secciones de hígado de 5-8 micras cortadas en el micrótopo se dejan secar toda la noche. Se aplica 15 minutos de vacío para evitar que el tejido se despegue del porta y se procede a eliminar la parafina de la muestra con tres lavados de xileno durante 5 minutos cada uno. La rehidratación de las muestras se realiza con lavados de 5 minutos de etanol a concentraciones decrecientes: 100%, 90%, 70% y 30%. Se lava en isotiocianato de sodio al 8% en agua destilada (NASCN: *Sodium Isothiocyanate*) durante 10 minutos a 75°C. Esto interrumpe la interacción del ADN con las proteínas, lo que favorece la hibridación. Se lava en PBS dos veces 5 minutos y se incuban con ácido

clorhídrico 0.1M (HCl) 10 minutos a temperatura ambiente. Lavar con agua y después con PBS. Posteriormente se deshidratan las muestras a concentraciones crecientes de etanol 70%, 90% y 100% un minuto y se dejan secar. Precalentar la sonda mediante desnaturalización a 75°C 10 minutos e incubar a 37°C de 30 a 60 minutos. Se añaden entre 12-15 µl de sonda desnaturalizada y el porta se sellar con esmalte de uñas transparente. Incubar 5 minutos y 15 segundos a 75°C, esto permite que las hebras de ADN del tejido y de la sonda se separen para su posterior hibridación donde participa la formamida (FLUKA 47670, Sigma-Aldrich) que lleva la sonda y da estabilidad. Se incuban a 37°C toda la noche en una cámara húmeda. Se elimina el esmalte de uñas y se realizan una serie de lavados que tienen como misión eliminar aquellos restos de sonda que hayan podido quedar en el tejido sin estar unidos de manera específica. Así se realiza, un lavado con tampón citrato sódico salino 2x (SSC *Sodium Chloride – Sodium Citrate*, ver Apéndice) 2 veces durante 3 minutos, un lavado con SSC 0,4x /NP40 0,3% a 55°C 3 minutos y con SSC 2x 2 minutos.

Tras haberse producido la hibridación, los siguientes pasos consisten en preparar el tejido para visualizar la sonda hibridada (Figura 17). Se lleva a cabo una incubación con solución de bloqueante compuesto por SSC 4x/ BSA 3%/ Tween-20 0,1% durante 30 minutos a 37°C en una cámara húmeda. A continuación se añade el anticuerpo primario anti-DIG-rhodamine conjugado con biotina (Biotin-SP conjugated IgG fraction Monoclonal Mouse Anti-Digoxin Lot Nº 81259 Roche) a una concentración de 1:100 en la misma solución de bloqueante (SSC 4x/ BSA1%/ Tween-20 0,1%) dejándolo a 37°C durante 1hora. Se lavan las secciones con SSC2x 2 veces durante 5 minutos y se incuban con 100µl del complejo ABC (del inglés *Avidin-Biotin-Complex Vector*, California, EE. UU) diluido 1:300 en PBS durante 1hora en oscuridad a temperatura ambiente. Esta incubación conlleva la formación de agregados de avidina, biotina y peroxidasa en torno a la biotina con la que se encontraba marcado el anticuerpo primario, lo que permite amplificar la señal. Al cabo de ese tiempo, se lava de nuevo con SSC2x para eliminar el exceso del complejo ABC no unido al tejido. Posteriormente se realiza un paso de amplificación de señal con tiramidas conjugadas con un fluorocromo, que consiste en la unión covalente de moléculas de tiramida a proteínas presentes en el tejido, sólo en torno a la peroxidasa del complejo ABC que junto con el H₂O₂ activan las tiramidas para emitir la señal. Se lava con tampón borato pH 8 durante 5 minutos y se incuba con las tiramidas (tiramidas rojas 1:3000 y H₂O₂ 1:5000 en tampón borato pH 8) 17 minutos en oscuridad. Los radicales de tiramida no depositados en la muestra forman dímeros que serán eliminados con lavados en PBS. Por último las muestras se incuban con DAPI (1:5000 en PBS) 5 minutos para marcar los núcleos de las células y poder conocer la localización de la

sonda del cromosoma Y en el tejido, identificando su citoarquitectura. El exceso de DAPI se elimina con lavados de PBS, se secan las muestras y se montan con cubreobjetos y medio de montaje.

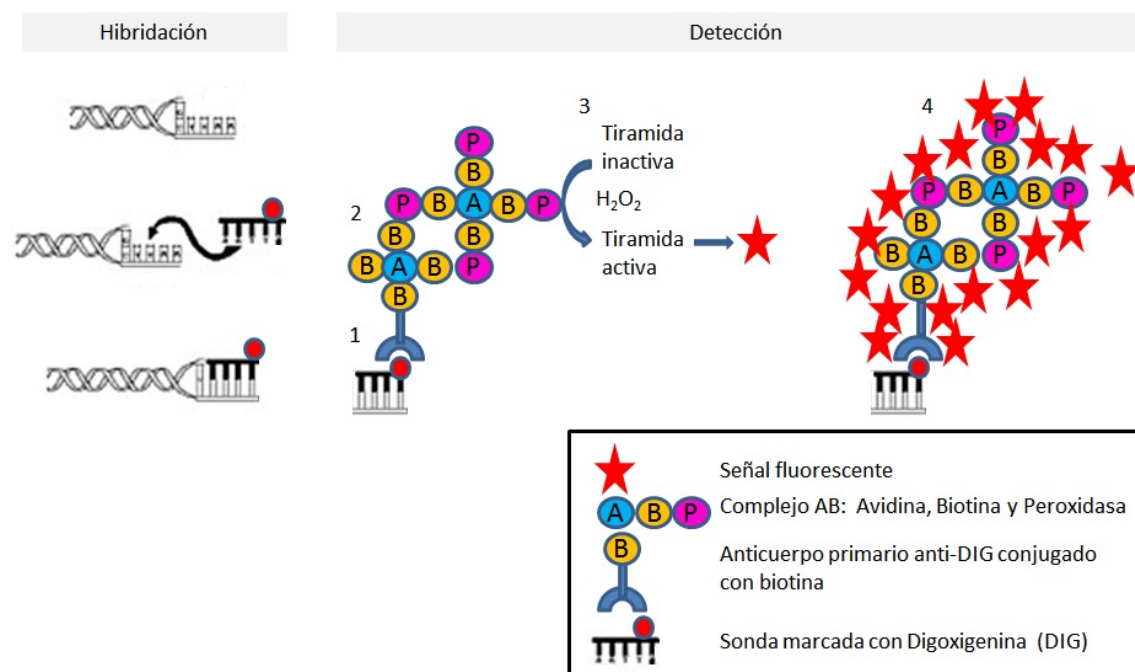


FIGURA 17. Esquema de hibridación y detección de la sonda mediante el proceso de amplificación con tiramidas.

La sonda marcada con digoxigenina después de la desnaturalización del ADN, reconoce una secuencia repetida del cromosoma Y de ratón e hibrida. El anticuerpo primario se une a la digoxigenina, y además lleva unida biotina (1). El complejo ABC produce la unión de avidina (A), biotina (B) y peroxidasa (P) a la biotina del anticuerpo (2). La peroxidasa, en presencia de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) cataliza la formación de tiramida activa (3) que formarán enlaces covalentes con los residuos de tirosina cercanos a la peroxidasa permitiendo la amplificación de la señal fluorescente (4).

TINCIÓN DAB INMUNO HISTOQUÍMICA

Para restringir el análisis de hibridación in situ del cromosoma Y a las zonas de hígado con células PLAP+ formando parches, previo a la hibridación realizamos una tinción inmunohistoquímica donde usamos DAB (3,3'-diaminobencidina, substrate kit for peroxidase SK-4100, VECTOR) como sustrato para detectar expresión de nuestro marcador. Se realiza una tinción con anticuerpos similar a la descrita anteriormente. Primero se incuban las secciones histológicas con solución de bloqueante (PBS 20% GS, 5% FCS) durante 90 minutos a temperatura ambiente, y se lavan en PBS tres veces durante 15 minutos. Se deja con el anticuerpo primario anti-PLAP (1:20) a 4°C toda la noche. Después del lavado en PBS se añade el anticuerpo secundario (*Sheep α Rabbit-bio*) a 1:200 1 hora a temperatura ambiente.

Se lavan en PBS y se incuban con estreptavidina conjugada con peroxidasa (1:400) (Stv Horseredish Peroxidase, 19534-015, Gibco BRL) 30 minutos. Se vuelve a lavar con PBS y finalmente se incuban con DAB 5 minutos. Lavar con agua y después con PBS. Ahora se puede empezar con la hibridación in situ.

ANÁLISIS DE RATONES DsRed: Criopreservación de tejidos y criosecciones

En los animales que tienen como marcador DsRed y DsRed:PLAP, la perfusión se realiza con PBS 0,001% de heparina, y los órganos troceados son fijados en Paraformaldehído al 4% durante 24 horas. Se lavan en PBS y posteriormente se incuban en sacarosa (141621.1211, Panreac) al 30% en PBS durante 24 horas, todo esto en oscuridad, en agitación y a 4°C. El tejido se transfiere a OCT (1S-LB-4583-EA, Sakura Finetek Tissue-Tek) dos horas y se congelan depositándolos sobre nieve carbónica. Las secciones se cortan en criostato (Leica CM 1850 UV) con un grosor de 10µm. Las secciones se dejan secar y se almacenan a -20°C. Entre 10 – 20 secciones no seriadas se recogen en 10 portas numerados. En portas alternos se determina la aparición de parches vasculares por tinción NBT.

La tinción NBT en crio-secciones se realiza de forma similar a la de secciones en parafina aunque con algunas variaciones. Las secciones se fijan 5 minutos en paraformaldehído 4%, se lavan en PBS y se inhibe la fosfatasa endógena en PBS a 75°C durante 35 minutos, después se lava en solución de lavado fosfatasa alcalina (0.1 M Tris-HCl a pH 9.5, 0.01 M MgCl₂, 0.1 M NaCl en agua milli q, ver Apéndice), y se transfieren a la solución de tinción (0.1 M Tris-HCl a pH 9.5, 0.05 M MgCl₂, 0.1 M NaCl, y 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/nitroblue tetrazolium (BCIP/NBT) en agua milli q, ver Apéndice). Se lavan en agua, se deshidratan y montan en DPX como se describió en secciones anteriores.

Secciones en portas contiguos a los que presentan parches NBT+ se tiñe con anticuerpos anti-PLAP (ver protocolo sección immuno-fluorescencia) para determinar la fluorescencia emitida por PLAP y DsRed en el microscopio confocal.

La proteína DsRed emite en el canal de luz roja (similar al A547), pero con una intensidad muy variable dependiendo del tipo celular. Es muy alta en hepatocitos y muy débil en endotelio. Por tanto, para compensar intensidades de emisión/detección en el microscopio confocal se necesitan los siguientes controles: un control silvestre, un transgénico para PLAP, un transgénico para DsRed y un doble transgénico para PLAP-DsRed. El ajuste de

intensidad de expresión de DsRed en la microvasculatura hepática se determina en parches vasculares previamente seleccionados por la expresión de PLAP en secciones contiguas.

CULTIVO DE ÓRGANOS DE TEJIDOS EMBRIONARIOS

Para el cultivo de AGM e hígado fetal en inter-fase líquido/gas se siguieron protocolos previamente descritos (Medvinsky and Dzierzak 1996). Una vez disecados los hígado fetales y los AGM en DPBS con Ca^{2+} y Mg^{2+} 10% FCS y al 1% de P/E, se depositan sobre un filtro Durapore 0.65 μm (DVPP02500, Millipore) colocado sobre una maya de acero inoxidable inmersa en 5ml de medio de cultivo para explantes (M5300, Stem Technology) 1% de P/E, previamente calentado a 37°C y suplementado con Succinato de Hidrocortisona (H2270-1mg, Sigma) a una concentración de 10^{-5}M . Son necesarias placas de seis pocillos (140675, NUNC). Se usan un máximo de 8 hígados ó AGM por filtro. Los órganos se cultivan durante 3 días a 37°C en 5% de CO_2 . Después, los tejidos son disgregados con 0.12% de collagenasa en DPBS 10%FCS durante 30 minutos a 37°C. La suspensión celular se re-suspende en DPBS 1%FSC para trasplante y análisis fenotípicos (Figura18).

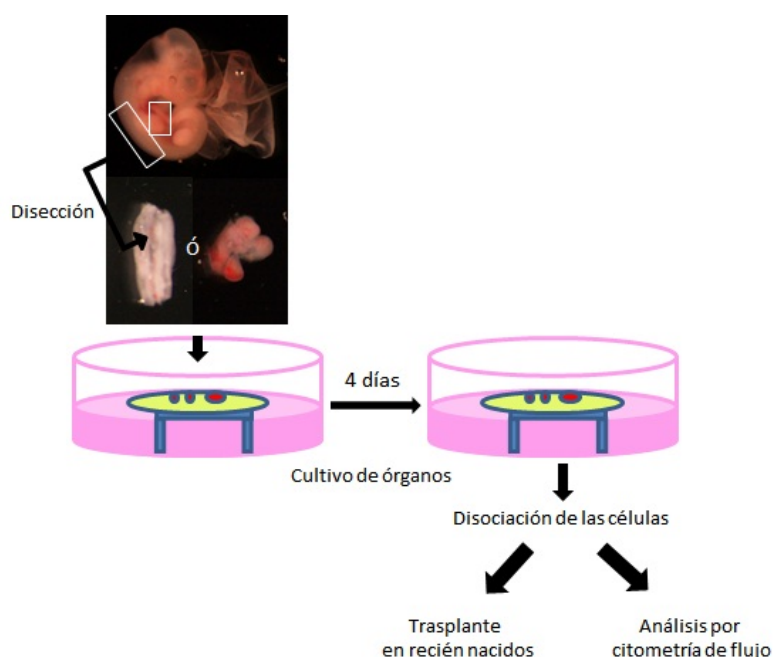


FIGURA 18. Diseño experimental de explantes.

Disección de hígado fetal o AGM. Se depositan encima de un filtro apoyado sobre una maya de acero inoxidable creando una inter fase líquido-gas. Se cultivan durante 3-4 días y se disocian las células con collagenasa. Después se cuentan las células y se analizan por citometría de flujo para caracterización de las mismas, y se analizan para la expansión de actividad vascular mediante el sistema de trasplante en recién nacidos.

ENSAYO DE FORMACIÓN DE REDES O TÚBULOS ENDOTELIALES. CO-CULTIVOS CON LA LÍNEA CELULAR OP-9

En la formación de redes endoteliales in vitro se usan co-cultivos de fracciones de células embrionarias con células estromales OP9 en presencia de medio de cultivo con 50ng/ml de VEGF (Taoudi, Morrison et al. 2005).

Células OP9

OP9 es una línea de células derivadas del estroma de la médula ósea de la línea ST2 (Kodama, Nose et al. 1992). Estas células necesitan un mantenimiento previo al co- cultivo para apoyar la diferenciación (Holmes and Zuniga-Pflucker 2009).

- **Descongelación de células OP9**

La descongelación se realiza rápidamente de -80°C a 37°C y las células se transfieren a un tubo falcón con 12 ml de medio OP9 MEM 10% FCS 1%P/E (*Minimum Essential Medium*, 12561056, Gibco; *fetal calf serum* SH3039603, Hyclone; Penicilina/estreptomicina, SV30010, Hyclone). Se centrifugan a 1400rpm durante 5 minutos a 4°C y el pellet se re suspende en 10 ml de medio OP9. Cultivar las células a una placa de 10cm a 37°C 5%CO₂ durante 2-3 días.

- **Mantenimiento**

Las células confluyen entre 2-3 días, antes de llegar al 80% de confluencia hay que pasar las células a nuevas placas. Se elimina el medio de la placa, y se lava con DPBS (D8537, Sigma-Aldrich). Se tratan con 4ml de tripsina al 0,25% (Trypsin, 2,5% (10x), 15090, Gibco) en PBS durante 5 minutos a 37°C. Se disgregan las células con el uso de la pipeta y se transfieren a un tubo falcón que contiene 4ml de medio OP9 para inactivar la tripsina. Lavar la placa con PBS para recoger las células restantes y transferirlas al tubo. Centrifugar a 1400rpm durante 5 minutos a 4°C y re suspender en 4ml de medio OP9. Transferir alícuotas de 1ml de células a placas de 10cm con 9ml de medio OP9 cada una. Mantener las células en división en un ratio 1-4, y pasarlas cada dos días. No mantener las células en cultivo continuo más de 6 semanas.

- **Congelación**

El paso de congelación es similar al de mantenimiento de las células. Se elimina el medio y se lava la placa con 4ml de DPBS. Se tratan las células con 4ml de tripsina al 0,25% en PBS durante 5 minutos a 37°C. Se disgregan las células y la suspensión se transfiere a un tubo falcón que contiene 4ml de medio OP9. Lavar la placa con PBS para eliminar las células restantes y transferirlas al mismo tubo. Centrifugar a 1400rpm durante 5 minutos a 4°C y re-suspender en 2ml de medio de congelación para células OP9 previamente enfriado (90%FBS y 10%DMSO). Es preferible congelar las células dentro de los 2 ó 3 primeros pases. La suspensión se divide en 2 alícuotas de 1ml en crio viales. Las células se congelan a -80°C.

Para el ensayo de diferenciación se recogen células OP9 en la fase de mantenimiento, y se pasan a placas de 96 pocillos (141804K, NUNC) sembrando de $3,5$ a 7×10^3 células por pocillo y las dejamos crecer durante dos días para que estén confluentes el día del co-cultivo.

Células fetales procedentes del AGM e hígado

Las suspensiones de células de AGM e hígado fetal se incuban con los anticuerpos anti-PLAP y anti-VE-Cadherina-biotina, seguido de incubación con el reactivo secundario fluoresceinado y fraccionamiento en el FACSaria.

Recogemos las poblaciones de células vivas PLAP+VE-Cad+, PLAP+VE-Cad- y PLAP-. Dejamos una parte de la población de células sin fraccionar. Se cuentan las células de cada fracción recogida correspondientes al hígado fetal y al AGM. Y se procede al co-cultivo con las células OP9 al 80% de confluencia en placas de 96 pocillos.

Co-cultivo

Los tubo con las poblaciones embrionarias seleccionadas en el FACSaria se centrifugan a 1500 rpm durante 5 minutos y se le añade medio de cultivo α -MEM (22561-021, Gibco) que contiene 10%FCS, 4mM Glutamina, 5 μ unit/ μ l P/S, se vuelven a centrifugar y se añade el mismo medio de cultivo pero suplementado con 2 β -mercaptoetanol a 0.1mM. Centrifugar y eliminar el sobrenadante. El volumen residual que contiene las células fraccionadas se divide en las placas con 96 pocillos donde estaban las células OP9. Antes hay que eliminar el medio de cultivo de las placas OP9 cultivadas durante 2 días. Repartir las células fraccionadas y no

fraccionadas en las placas con células OP9 y añadir medio de cultivo con 2 β -mercaptoetanol a 0.1mM y VEGF a una concentración de 50ng/ml. Dejar en cultivo durante 4 días a 37°C y 5% de CO₂ (Nishikawa, Nishikawa et al. 1998; Fraser, Ogawa et al. 2003). Fotografiar antes y después de la tinción con CD31.

Tinción con CD31 de células co-cultivadas con OP9 para identificar el desarrollo endotelial

Se elimina el medio de las placas con el co-cultivo y se lavan con PBS. Se incuban durante 10 minutos a temperatura ambiente con 500 μ l de 5% DMSO/metanol. Lavar dos veces con PBS e incubar con 500 μ l de 0,3% H₂O₂/Metanol durante 30 minutos a temperatura ambiente. De nuevo se lavan con PBS varias veces y se añaden 250 μ l de leche descremada (sin grasa) al 3% en PBS incubando las placas durante 10-20 minutos. Se elimina el contenido y se tiñe con el anticuerpo primario (*anti-mouse CD31*, 557355, BD Pharmingen) (1:200) diluido en leche descremada al 3% en PBS durante toda la noche a 4°C. Se lava las placas tres veces con PBS/Tween-20 al 0,05% y se incuban durante una hora con el anticuerpo secundario conjugado con biotina (*Anti-rat biotin conjugated*, 559286, BD Pharmingen) (1:200) en solución de bloqueo. Se lava varias veces en PBS/Tween-20 0,05%. Y se añade Estreptavidina- Peroxidasa (19534-015, Gibco) (1:400 en PBS) 30 minutos y de nuevo se lavan con PBS/Tween-20 al 0,05% para teñir con DAB (DAB substrate kit for peroxidase SK-4100 VECTOR) durante 30 minutos. Lavar con PBS/Tween-20 al 0,05% y fijar las células con paraformaldehído al 4%.

Fotografiar los pocillos correspondientes a cada fracción de células purificada y la no fraccionada para comparar los resultados.

TINCIÓN INMUNO- FLUORESCENTE DE EMBRIONES

Seguimos un protocolo previamente descrito (Yokomizo and Dzierzak 2010) con ciertas modificaciones en cuanto al uso de anticuerpos. Embriones de 11 días de gestación son fijados durante 20-30 minutos en 2%Paraformaldehído /PBS en hielo, y deshidratados a concentraciones ascendientes de metanol/ PBS (50%, 75%, 100%, 10 minutos en cada). Se retira el saco vitelino, la mitad del cuerpo incluyendo la cabeza, la pared lateral y las extremidades. Las muestras se rehidratan con 50% de metanol/PBS y varios lavados de PBS en frío con una duración de 10 minutos. La actividad de la biotina endógena se bloquea con

un kit de bloqueo (Streptavidin/ biotin Blocking KIT SP-2002, Vector Laboratories, Inc.) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para cubrir los embriones se necesita un volumen de 500 µl de cada solución. Primero se incuban a temperatura ambiente con estreptavidina (3gotas)/1ml PBS durante 15 minutos. Se lavan en PBS 10 minutos en hielo y se incuban con biotina (3gotas)/1ml PBS durante 15 minutos a temperatura ambiente. De nuevo se lava en PBS 10 minutos en hielo. El bloqueo termina con una incubación en hielo de 1 hora aproximadamente con Suero de cabra (Normal Goat Serum, 005-000-001, Jackson Immuno Research) /BSA 10% en PBS /PBS-MT (1% Skim milk, 0,4% TritonX-100 Sigma-Aldrich). Todas las incubaciones y lavados posteriores se llevan a cabo a 4°C con agitación suave en una plataforma oscilante. Las muestras se incuban toda la noche con el anticuerpo primario diluido en PBS-MT: 1% Skim milk, 0,4% TritonX-100 Sigma- Aldrich, y se lava tres veces en PBS-MT durante todo el día siguiente (2-3 horas por lavado). El anticuerpo secundario se añade en PBS-MT y se incuban toda la noche. Cuando se usan múltiples anticuerpos de diferentes isotipos, todos los anticuerpos primarios (y en el siguiente paso todos los anticuerpos secundarios) se añaden de forma simultánea. Si los anticuerpos primarios son de la misma especie, la incubación de los primarios y secundarios se realiza de forma secuencial.

Los anticuerpos usados se describen en las siguientes tablas:

TABLA 10. Lista anticuerpos primarios para tinción inmuno-fluorescente de embriones

Nombre (clon)	Concentración	Especie donde se genera	Nº de catálogo	Casa comercial
Anti-human Placental Alkaline Phosphatase (PLAP)	1:100	Rabbit	AHP537	AbD; Serotec
Anti-mouse CD31 Biotin (MEC 13.3)	1:500	Rat	553371	BD Pharmingen
Anti-mouse CD45 Purified (30-F11)	1:500	Rat	550539	BD Pharmingen

TABLA 11. Lista anticuerpos secundarios para tinción inmuno-fluorescente de embriones.

Nombre	Concentración	Especie donde se genera	Nº de catálogo	Casa comercial
Anti-rabbit Alexa Fluor 488	1:1000	Goat	A-11008	Molecular Probes
Anti-rat Alexa Fluor 647	1:5000	Goat	A-21247	Molecular Probes
Cy3-Streptavidin	1:1000		016-160-084	Jackson Immunoresearch

El orden seguido para añadir los anticuerpos fue el siguiente: primero el anticuerpo primario CD45, seguido de su secundario anti-rat A647, después de los lavados correspondientes, se incubaron juntos los anticuerpos primarios PLAP y CD31biotinilado, y posteriormente los secundarios anti-rabbit A488 y Cy3-estreptavidina, respectivamente.

Después de la incubación con el anticuerpo secundario final, las muestras se lavan en PBS-MT varias veces y se deshidratan en metanol al 50% en PBS y al 100% durante 10 minutos cada paso.

Las muestras se montan en una mezcla de BABB: *benzyl alcohol* (B-1042, Sigma-Aldrich): *benzyl benzoate* (B-6630, Sigma-Aldrich) en un ratio (1:2) para incrementar la transparencia de los tejidos. Se prepara agarosa con bajo punto de fusión (A9414, Sigma-Aldrich) al 1% en agua, cuando se encuentra a 50°C, se depositan 10µl sobre un cubre objetos montado en una cámara (Fast Well TM FW20 Item, 664113, Grace Bio Labs) (Figura 19). Un extremo de la muestra se coloca en la agarosa y rápidamente se añade metanol al 100%. El metanol se sustituye varias veces (con 1 minuto entre enjuagues) y luego se sustituye dos o tres veces con 50%BABB/metanol, y a continuación, con 100% BABB dos o tres veces hasta que la muestra se aclare. Un segundo cubre objetos se coloca en la cámara Fast Well, y un porta objetos de vidrio asegura la parte superior con esmalte de uñas transparente.

Las muestras se analizan con un microscopio confocal (Zeiss LSM 510 Meta, Plan-Neofluar 20 / NA 0,5, Achroplan 40 / NA 0,8 W, Achroplan 63 / NA 0.95W) mediante el uso de multi-pista en modo secuencial. Los embriones inmovilizados por la agarosa al 1% se quedan en la cámara FastWell con 1mm de profundidad, y se toman fotos en sección en Z con 0.8- 2.3 µm.



FIGURA 19. Forma de montaje de los embriones para detección inmuno-fluorescente.

La cámara (Fast Well) contiene un material adhesivo que permite unirse en los bordes del cubre objetos dejando un hueco en medio donde depositar las muestras. La cámara (Fast Well) por sus bordes se une también al porta objetos. Después de montar las muestras con la sacarosa y de lavar varias veces con metanol y BABB, un segundo cubre objetos se adhiere por los bordes en el otro lado de la cámara (Fast Well) para cerrar la muestra. Un segundo porta objetos asegura la parte superior con esmalte de uñas transparente. Damos la vuelta rápidamente para analizar las muestras en el microscopio.

RESULTADOS

1. POTENCIAL HEMATO-VASCULAR DE CÉLULAS FETALES VS ADULTAS EN TRASPLANTES

El sistema empleado para determinar la contribución vascular de células de hígado fetal consiste en trasplantar células genéticamente marcadas en ratones, generar quimeras hematopoyéticas a largo plazo y analizar la presencia de células donantes en la vasculatura. El marcador trazador de linaje vascular y el modelo de receptor del trasplante son factores a tener en cuenta en el análisis de potencial vascular. Por tanto, el primer punto a analizar es la expresión del marcador SCL3'EnhPLAP en todos los endotelios. Respecto al tipo de receptor, elegimos recién nacidos tratados con busulfán, que presentan gran actividad vasculogénica y además son un modelo para testar la repoblación de las células madre hematopoyéticas, sirviendo como control endógeno de éxito de trasplante (Yoder, Cumming et al. 1996; Yoder, Hiatt et al. 1997). También se emplea el trasplante en adulto irradiados, modelo clásico para determinar actividad de repoblación hematopoyética y contribución vascular (Asahara, Murohara et al. 1997; Grant, May et al. 2002; Bailey, Jiang et al. 2004; Jiang, Walker et al. 2004; Bailey, Willenbring et al. 2006). Emplear un segundo modelo es importante ya que la probabilidad de integración de las células donantes puede también estar modulada por el estado de desarrollo del donante y del receptor (Taylor, McElmurry et al. 2002; MacLaren, Pearson et al. 2006). En ambos casos las células donantes se transfieren al torrente sanguíneo.

1.1 Patrón de expresión del vector SCL3'Enh-PLAP en vasculatura de ratones transgénicos adultos.

La vasculatura constituye un sistema tisular ubicuo. En general, los vasos están formados por células endoteliales bordeando el lumen, y en algunos casos rodeadas de podocitos y músculo liso. Sin embargo, cada órgano tiene particularidades concretas respecto a la composición vascular (endotelio arterial, venoso, microvascular, fenestrado entre otros). Para trazar el linaje vascular de progenitores trasplantados, es de suma importancia determinar si el vector de expresión trazador es activo en la vasculatura de todos los órganos potenciales objeto de estudio. Para ello hemos extendido el estudio publicado previamente sobre la expresión de SCL3'Enh-PLAP en la vasculatura de animales transgénicos (Silberstein, Sanchez et al. 2005; Pimanda, Silberstein et al. 2006), a un gran

numero de tejidos. Para la detección de PLAP en secciones de tejidos se emplea el NBT (un sustrato de la fosfatasa alcalina que proporciona información sobre la expresión del vector de una manera rápida y económica). La tinción con NBT muestra que los endotelios vasculares (definidos por criterios morfológicos) de todos los órganos analizados expresan el vector SCL3'Enh-PLAP (Figura 20). Mediante el empleo de anticuerpos específicos y análisis de expresión de fluorescencia en microscopio confocal, corroboramos la co-expresión de PLAP con marcadores asociados a la vasculatura (CD31 e Isolectine B4) y a sangre (CD45). Todas las células endoteliales, independientemente del órgano analizado, expresan PLAP (células PLAP+CD45-IsoB4+) (Figura 21). Además, en las secciones existen otras células PLAP+ no endoteliales. De acuerdo a la expresión de CD45 y IsoB4 las células PLAP+ se clasifican en: PLAP+CD45-IsoB4+ (endoteliales), PLAP+CD45-IsoB4- (hematopoyéticas) y PLAP+CD45-IsoB4- (células intersticiales de naturaleza indeterminada). La población endotelial PLAP+CD45-IsoB4+ predomina en el hígado, músculo cardiaco (Figura 21A y C), músculo liso, médula ósea y páncreas, mientras que la población endotelial PLAP+CD45-IsoB4+ e intersticial PLAP+CD45-IsoB4- pueden visualizarse claramente en riñón (Figura 21B) y pulmón. La población hematopoyética PLAP+CD45-IsoB4- es mas prominente en órganos hematopoyéticos como la médula (Figuras 20 y 22A).

Por tanto, este estudio pone de manifiesto que el SCL3'Enh-PLAP se expresa en todo el endotelio analizado constituyendo un excelente marcador vascular en todos los órganos. Así mismo, es interesante resaltar que el vector SCL3'Enh fue inicialmente descrito en médula como un marcador de células madre, progenitores hematopoyéticos y algunos linfocitos T (Sanchez, Bockamp et al. 2001), por tanto, no podemos descartar que ésta sea la naturaleza de las poblaciones PLAP+CD45-IsoB4- o PLAP+CD45-IsoB4- en otros órganos. (Kiel, Yilmaz et al. 2005).

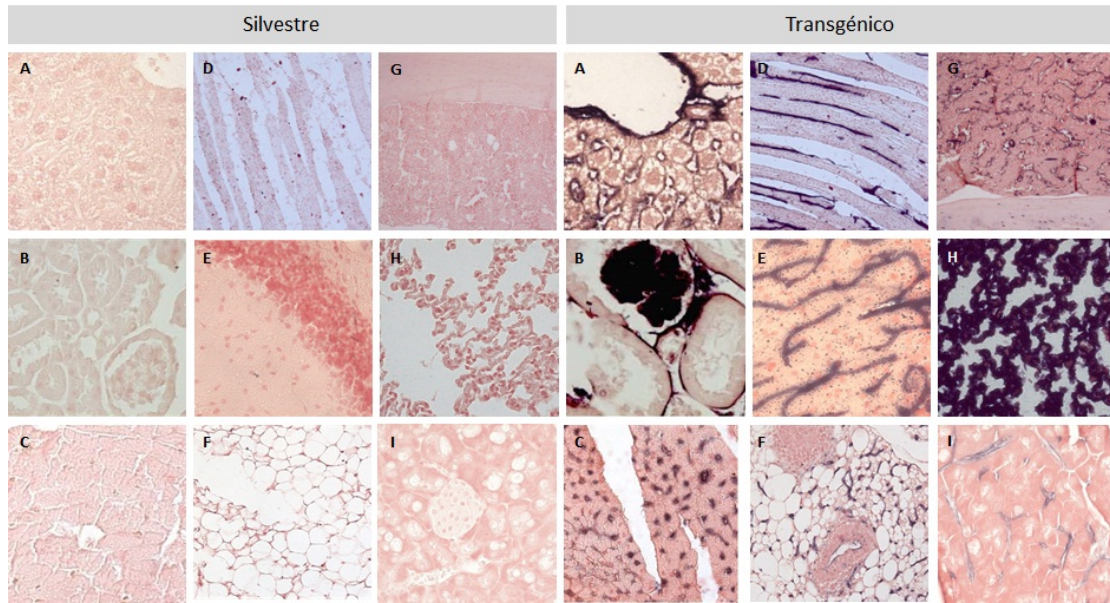


FIGURA 20. Expresión del vector SCL3'Enh-PLAP en órganos adultos.

Detección histoquímica de la actividad PLAP mediante tinción NBT en secciones de diferentes órganos: hígado (A), riñón (B), corazón (C), músculo esquelético (D), cerebro (E), glándula mamaria (F), médula ósea (G), pulmón (H) y páncreas (I), de ratones silvestres y transgénicos. Fotos tomadas con el microscopio Leica DM5000B a un aumento de 400x.

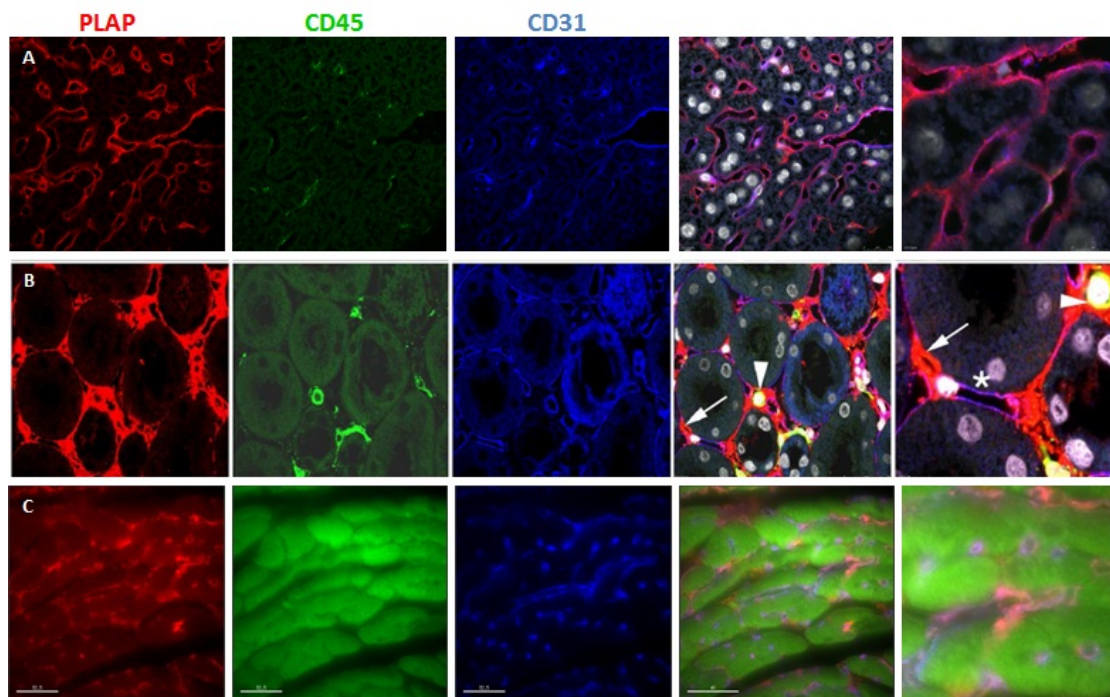


FIGURA 21. Caracterización de las células SCL3'EnhPLAP+ en órganos adultos mediante inmuno-fluorescencia.

Las secciones de hígado (A), riñón (B) y corazón (C) de ratones transgénicos son teñidas con anticuerpos anti-PLAP (rojo), anti-CD45 (verde), anti-CD31 (azul) y Dapi (núcleos grises). En el hígado y corazón la gran mayoría de las células PLAP+ son endoteliales. En el riñón, se pueden observar células endoteliales PLAP+CD45-IsoB4+ (*), células hematopoyéticas PLAP+CD45-IsoB4- (punta de flecha) y células intersticiales PLAP+CD45-IsoB4- (flecha). Imágenes tomadas en el microscopio confocal Leica DM2500/TCS usando el programa LAS AF con los láseres 488, 532, y 635. Con un aumento de 400x y 63

1.2 Determinación de la repoblación hematopoyética de células de hígado fetal y médula ósea adulta en trasplantes en recién nacidos y adultos irradiados.

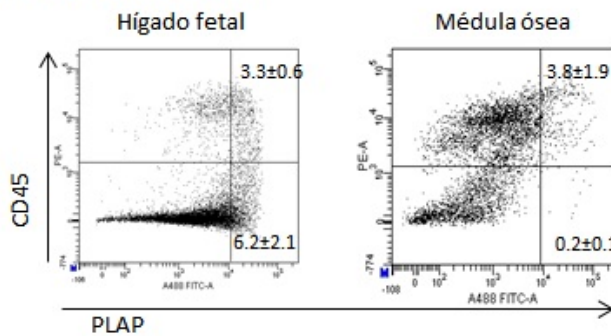
Para comparar el potencial hematopoyético de células fetales y adultas en trasplantes en receptores recién nacidos tratados con busulfán y receptores adultos irradiados, se transfieren vía intravenosa 10^6 células de hígado fetal derivadas de embriones de día 12 (E12) ó 5×10^6 células de médula ósea adulta que contienen un número equivalente de células SCL-PLAP^{brillantes}, denominadas PLAP+, (entre 3×10^4 a 6×10^4), población que contiene la mayoría de células madre hematopoyéticas como trabajos previos del grupo demostraron (Silberstein, Sanchez et al. 2005) (Figura 22A).

La frecuencia de animales que presentan injerto hematopoyético un mes después del trasplante se determina mediante análisis PCR para PLAP en sangre periférica. La capacidad de repoblación hematopoyética a largo plazo, se determina entre los 5 y 10 meses en sangre periférica y en órganos hematopoyéticos mediante FACS-PLAP y PCR-PLAP semicuantitativa (Figura 22 B, C).

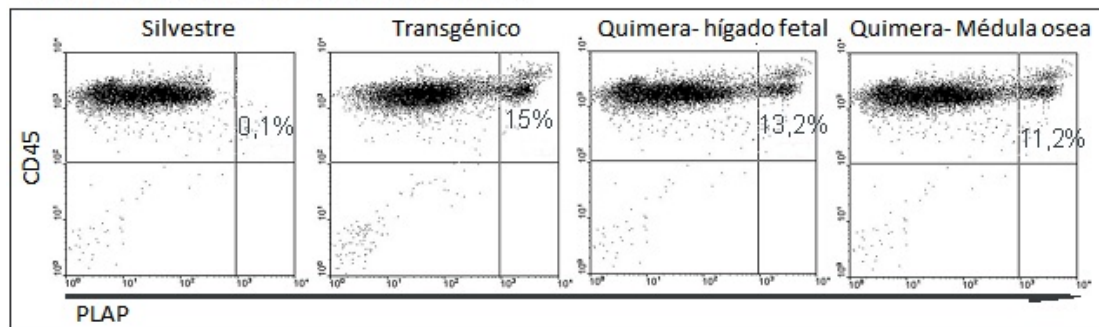
Estos análisis indican que:

En receptores recién nacidos, la frecuencia de quimeras hematopoyéticas de hígado fetal es más elevada que de médula ósea de adulto (frecuencia de 100% con células fetales versus 78% con células adultas) (Tabla 12). Similar relación se mantiene empleando receptores adultos irradiados (frecuencia 83% con células fetal versus 60% con células adultas). Estos resultados confirman datos previos de otros autores, donde empleando un ensayo más específico de repoblación competitiva en receptores irradiados, demuestran el incrementado potencial de injerto hematopoyético de las células de origen fetal versus células de adulto de médula ósea (Rebel, Miller et al. 1996; Harrison, Zhong et al. 1997; Bowie, Kent et al. 2007).

A. CÉLULAS DONANTES



B. REPOBLACIÓN HEMATOPOYÉTICA EN SANGRE



C. CONTRIBUCIÓN A OTROS ÓRGANOS HEMATOPOYÉTICOS

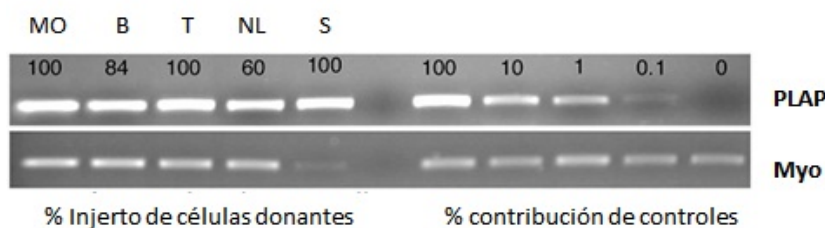


FIGURA 22. Análisis de repoblación hematopoyético.

A. Perfiles de citometría de flujo de células donantes para la expresión de PLAP y CD45 en hígado fetal de día 12 y médula ósea adulta. B. Perfiles de citometría de flujo de sangre periférica para la expresión de PLAP y CD45 en un ratón silvestre, un ratón transgénico SCL3'Enh-PLAP, una quimera de hígado fetal y una quimeras de médula ósea analizadas a largo plazo (5-10 meses después del trasplante). C. Análisis por PCR semicuantitativa para PLAP de órganos hematopoyéticos de una quimera de hígado fetal analizada a largo plazo. ADN aislado de médula ósea (MO), bazo (B), timo (T), nódulos linfáticos (NL) y sangre periférica (S). El análisis por PCR se realiza usando los oligonucleótidos para los genes PLAP y Miogenina (Myo). El porcentaje de injerto de células donantes se calcula usando como control una escalera de contribución hematopoyética del 100%, 10%, 1%, 0,1% y 0%, generada por diluciones entre muestras transgénicas y silvestres. La miogenina sirve como normalización estándar. El porcentaje de injerto de células donantes está indicado en cada banda y se calcula utilizando el programa Gel-Pro.

TABLA 12. Frecuencia de repoblación hematopoyética en trasplantes de células de hígado fetal y de médula ósea.

Receptor	Células donantes	Nº de células trasplantadas/receptor	Nº ratones PLAP+ en sangre/ Nº ratones trasplantados	% FACS- PLAP+ en sangre ^(a)
Recién nacido	Hígado fetal	10 ⁶	11/11	8±3.5
	Médula ósea	5 x 10 ⁶	10/13	13±5
Adulto Irradiado	Hígado fetal	10 ⁶	5/6	9.5±1.6
	Médula ósea	5 x 10 ⁶	6/10	8.6±1.9

^a Porcentaje de células PLAP+ en circulación determinado por análisis FACS. Valores FACS-PLAP en sangre periférica para los controles: transgénico adulto, 11±5%; silvestre, 0%. Los valores para cada quimera están desarrollados en la tabla 13 Y 14.

1.3 Determinación de la repoblación vascular del hígado.

La localización y cuantificación de células donantes SCL3'Enh-hPLAP+ en la vasculatura se determinó por tinción NBT en secciones de diferentes órganos obtenidos de quimeras hematopoyéticas de alto nivel, 5-10 meses post trasplante. En trasplantes en recién nacidos, las secciones de hígado de las quimeras trasplantadas con células de hígado fetal presentaban dos patrones de distribución de células PLAP+ relacionados con la vasculatura: un patrón formando estructuras similares a parches vasculares de microvasculatura alrededor de los hepatocitos y un patrón alrededor de vasos de mediano y gran calibre (macrovasculatura) incluyendo alguna célula endotelial, que forman, en general, parte de los espacios portales similares a los descritos por otros autores (Bailey, Willenbring et al. 2006). También se observaban células dispersas por toda la superficie que no formaban parte un patrón vascular obvio (Figura 23). En quimeras trasplantadas con médula ósea adulta los parches vasculares de microvaculatura PLAP+ no eran observados. Estas quimeras solo presentaban señal dispersa no asociada a vasculatura y alrededor de los vasos medianos (Figura 23).

En trasplantes en adultos irradiados, las células donantes de hígado fetal también podían contribuir a la vasculatura y formar estructuras similares a parches de microvasculatura, capacidad ausente en las células de médula ósea adulta. Sin embargo, ambos tipos de células donantes pueden contribuir a las células perivasculares y vasculares de los vasos de mediano calibre, de forma similar a como ocurría en trasplantes en recién nacidos (Tabla 13). Hay que resaltar que solo 3 de 5 animales (60%) trasplantados con células fetales presentaban parches vasculares en el hígado (Tabla 13), sugiriendo que la eficiencia de contribución vascular fetal podría estar comprometida en los trasplantes de adultos irradiados. No se puede descartar que el ambiente proporcionado por una etapa apropiada

de desarrollo, como son receptores recién nacidos, puede tener ventajas para la integración e injerto de células fetales en la contribución vascular (Yoder, Hiatt et al. 1997; Young, Hofling et al. 2002).

Para confirmar la naturaleza vascular de la señal NBT se realizaron tinciones con anticuerpos específicos para célula de sangre (CD45) y endotelio vascular (Isolectina B4 y CD31) en combinación con anticuerpos anti-PLAP. La mayoría de las células PLAP+ en el parche co-expresaban Isolectina B4 y eran negativas para CD45, indicando una naturaleza endotelial. Las células PLAP+ que se disponen alrededor de los vasos están compuestas principalmente por células sanguíneas CD45+ y algunas endoteliales CD45-IsoB4+. Las células distribuidas de forma dispersa, no asociadas a vasos, son en general CD45+ (Figura 24).

Por tanto, estos experimentos demuestran que, independientemente de tipo de receptor, las células de hígado fetal contienen poblaciones celulares que una vez trasplantadas se incorporan extensamente a la microvasculatura como parches de células endoteliales, a los espacios portales como células peri-vasculares sanguíneas y endoteliales, y como células dispersas no asociadas a vasculatura. Las células de médula ósea de adulto solo se incorporan a espacios per-ivasculares y como células dispersas.

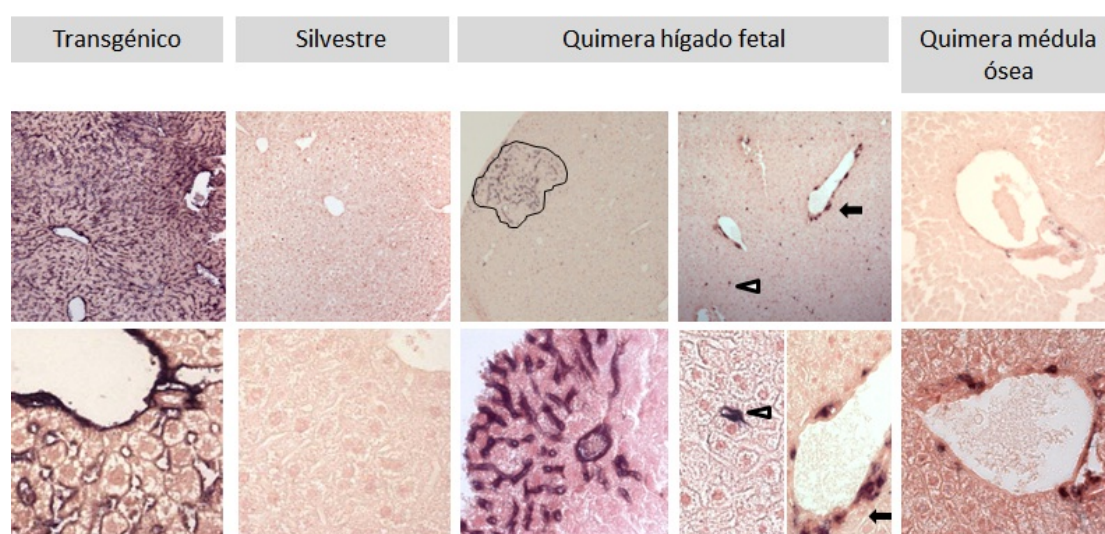


FIGURA 23. Repoblación vascular del hígado.

Detección de células donantes PLAP+ mediante tinción NBT en secciones de hígado procedente de ratones transgénicos SCL3'EnhPLAP, silvestres y quimeras de hígado fetal y de médula ósea. Las células de hígado fetal se distribuyen formando estructuras similares a parches vasculares PLAP+ (rodeado a mano alzada), alrededor de los vasos sanguíneos (flecha) y también de forma dispersa (punta de flecha), mientras que las células de médula ósea injertan alrededor de los vasos sin formar parches. Fotos tomadas con el microscopio Leica DM5000B a un aumento de 100x panel de arriba y 400x panel inferior.

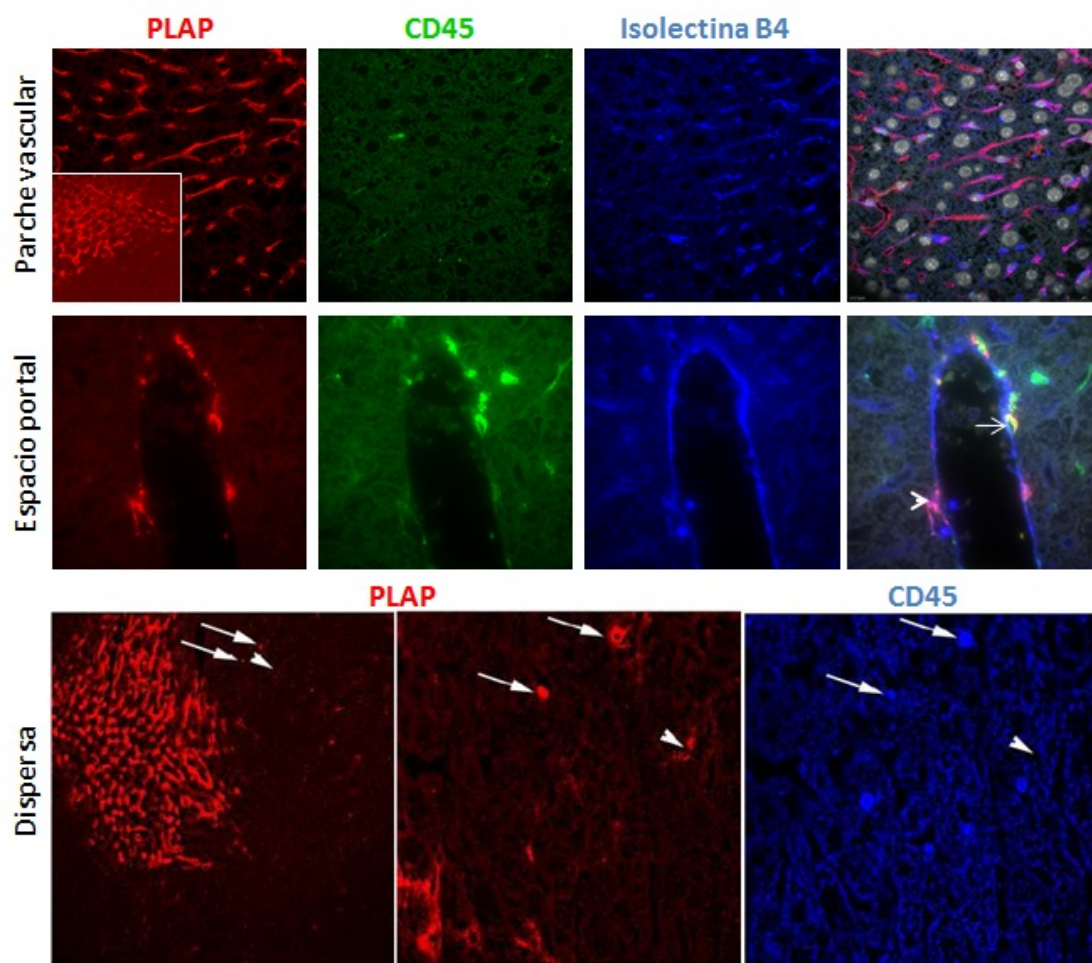


FIGURA 24. Caracterización de células donantes SCL3'Enh-PLAP+ integradas en hígado.

Se muestran secciones de hígado de quimeras trasplantadas con células de hígado fetal teñidas con anticuerpos anti-PLAP (rojo), anti-CD45 (verde ó azul), IsolectinaB4 (azul) y Dapi (núcleos grises). Imágenes representativas de las diferentes formas de repoblación hemato-vascular: en forma de parche, alrededor de espacios portales y de forma dispersa. Los parches tienen naturaleza endotelial (PLAP+IsoB4+), la señal PLAP+ alrededor de los vasos está compuesta por células sanguíneas (CD45+, flecha) y algunas endoteliales (CD45-IsoB4+, punta de flecha), mientras que las células dispersas PLAP+ son mayoritariamente CD45+ (flecha). Imágenes tomadas en el microscopio confocal Leica DM2500/TCS usando el programa LAS AF con los láseres 488, 532, y 635. Con un aumento de 400x y 600x.

1.3.1 Cuantificación de señal dispersa NBT positiva por fraccionamiento de colores "threshold method"

Para realizar una valoración objetiva de la contribución a la vasculatura de células fetales y adultas, pusimos a punto la cuantificación de la señal PLAP en secciones de tejido teñidas con NBT. Para la cuantificación se emplearon dos modalidades del programa de cuantificación de imágenes "analySIS": -Cuantificación de señal dispersa NBT positiva

(asociada y no asociadas a vasos medianos) por fraccionamiento de colores "threshold method" y -cuantificación del área de parches por el método de acotamiento zonal.

Los resultados de la cuantificación de señal dispersa, demuestran, en quimeras hematopoyéticas de similar nivel, un incremento notable de células PLAP+ dispersas en secciones de hígado de quimeras trasplantadas con células de hígado fetal. Para los trasplantes en recién nacidos la media de valores fue de $1.2\% \pm 1.1\%$ versus $0.5\% \pm 0.3\%$, $p < 0.1$, de señal NBT dispersa en quimeras trasplantadas con células de hígado fetal y de médula ósea, respectivamente. En los trasplantes en adultos irradiados los resultados obtenidos fueron de $1\% \pm 0.4\%$ versus $0.15\% \pm 0.1\%$, $p < 0.04$, de señal NBT dispersa en quimeras trasplantadas con células de hígado fetal y de médula ósea, respectivamente (Tabla 13).

La cuantificación de la señal dispersa por fraccionamiento de colores "threshold method" no permitía discriminar entre las células que forman parte de los vasos de mediano calibre (espacios portales hepáticos) y la no asociada a vasculatura. Para determinar la asociación a espacios portales, se ha contabilizado la frecuencia de espacios portales que presentan señal NBT (un espacio portal se considera positivo cuando presentan un mínimo de 3 células PLAP+). En general también se observa un incremento de la frecuencia de espacios portales positivos en quimeras trasplantadas con células fetales ($10.6\% \pm 8.6$) respecto a la trasplantadas con adultas ($6.6\% \pm 5.4$) (Tabla 13). Como ya se indicó, las células PLAP+ de espacios portales se localizan en posición peri-vascular y endotelial.

El incremento de señal dispersa en quimeras de hígado fetal comparado con quimeras de médula ósea sugiere una mayor capacidad de células fetales para acceder, injertar y/ o establecerse en el hígado. De hecho, resultados previos de otros grupos demuestran que células hematopoyéticas fetales presentan mayor capacidad migratoria a través del endotelio (Yong, Fahey et al. 2002). La naturaleza y función de las células peri-vasculares queda pendiente de análisis. Trabajos de otros autores muestran como células similares derivadas de médula ósea tienen un papel importante en la producción de VEGF y homeostasis vascular (Grunewald, Avraham et al. 2006).

TABLA 13. Frecuencia de repoblación hemato- vascular en quimeras trasplantadas con hígado fetal y médula ósea

Receptor	Células donantes	Quimera	%FACS-PLAP+ en sangre	% Señal PLAP+ dispersa	% Vasos con células PLAP+ ^(*)	Frecuencia de parches PLAP+ ^(**)
Recién nacido	Hígado fetal	1 (1779)	12.9	0.68	1.8	+++
		2 (1290)	8.4	0.75	19	+++
		3 (1399)	8	3.63	11.11	+++
		4 (1775)	6.6	0.90	NC	+++
		5 (1291)	13.8	0.45	NC	+++
		6 (1293)	10.5	1.24	NC	+++
		MEDIA (n=6)	10±2	1.27±1.1	10.6±8.6	(6/6)
	Médula ósea	1 (2190)	20	1.01	13.4	-
		2 (2191)	12	0.44	6.1	-
		3 (1167)	13.6	0.18	0	-
		4 (2188)	7.3	0.62	6.9	-
		5 (1168)	PCR+	0.48	NC	-
		MEDIA (n=5)	13±5	0.54±0.3	6.6±5.4	(0/5)
Adulto Irrradiado	Hígado fetal	1 (3468)	12	0.23	NC	-
		2 (3469)	9.7	1.0	NC	-
		3 (2974)	8.4	1.2	NC	+++
		4 (2977)	7.6	1.5	NC	+++
		5 (3456)	9.9	1.1	NC	+
		MEDIA (n=5)	9.5±1.6	1.0±0.4		(3/5)
	Médula ósea	1 (2396)	10	0.1	NC	-
		2 (2266)	7.2	0.04	NC	-
		3 (3851)	PCR+	0.0	NC	-
		4 (3830)	PCR+	0.0	NC	-
		5 (3835)	PCR+	0.0	NC	-
		6 (3809)	PCR+	0.4	NC	-
		MEDIA (n=6)	8.6±1.9	0.1±0.1		(0/5)
Transgénico		19±2	NC			
Silvestre		0	0.0			

Para cada animal se determina el porcentaje de células PLAP+ en circulación por análisis FACS. Secciones de hígado se tiñen para NBT como muestra en la figura 22. Empleando los métodos de análisis y cuantificación de imagen por threshold se determina la señal dispersa, y se contabiliza el número de vasos sanguíneos con células PLAP+ a su alrededor respecto del total de vasos sanguíneos de mediano calibre por el que está compuesto cada sección, representándolo en porcentaje. (*)Referido a 200-400 espacios portales por individuo. En secciones no consecutivas realizamos una cuantificación de frecuencia de aparición de parche. (**) Los valores relativos asignados eran: +++ (alta frecuencia), cuando al menos un parche NBT+ era detectado en cada 5-10 secciones; ++ (baja frecuencia), cuando al menos un parche era detectado en cada 10-20 secciones; + (muy baja frecuencia), cuando un parche era detectado al menos una vez; -, cuando no se observaba ningún parche.

PCR+: señal de donante en sangre determinado por PCR-PLAP.

NC: no cuantificado

1.3.2 Cuantificación del número y área relativa de parches NBT+ por acotamiento zonal

Inicialmente, la estimación de parches vasculares PLAP+ se estableció en relación al número de secciones analizadas, asignando valores relativos “+++” cuando al menos se detectaba un parche en 5-10 secciones no seriadas y negativo (-) cuando en 30 secciones no se detectaba ningún parche (Tabla 13). Todas la quimeras hematopoyéticas de hígado fetal se les asigno el valor +++.

Para realizar una valoración más exacta de contribución a la vasculatura en forma de parche y determinar el grado de correlación con los niveles de células PLAP+ en circulación, cuantificamos el número y el área de parches en al área total analizada empleando el método de acotamiento zonal de área (ver materiales y métodos). Para el análisis se eligieron dos experimentos de trasplante de células de hígado fetal en recién nacidos donde las 5 quimeras obtenidas presentaban un rango variable de contribución hematopoyética en sangre. En el experimento ‘1’ se obtuvieron 3 quimeras con un 6.7, 4.3 y 1.3 % de células PLAP+ en sangre. Sin embargo, la cuantificación del número de parches da una frecuencia de 6, 1 y 3 parches por cm^2 , respectivamente (Tabla 14). En el segundo experimento, quimeras con diferente porcentaje de células donantes PLAP+ en circulación (8 y 4%, respectivamente) tienen una frecuencia de parches idéntica (4 parches/ cm^2) (Tabla 14). Aunque el tamaño de los parches individuales es variable ($0.01 - 0.05 \text{ mm}^2$) el área total de parche es proporcional al numero y no se observan parches predominantemente grandes en ninguna quimera. Por tanto, estos datos, aunque limitados en número, descartarían una correlación entre niveles de quimerismo hematopoyético y extensión de parches de microvasculatura derivada del donante

TABLA 14. Cuantificación del número y extensión de área relativa de parches vasculares PLAP+ en secciones de hígado.

	Quimera	%FACS- PLAP+ en sangre	Área total analizada (cm ²)	Nº de parches PLAP+	Área de parches PLAP+ (cm ²)	Nº parches PLAP+/cm ²	Área de parches PLAP+/cm ² (x 10 ⁻⁵)
Experimento 1	1 (6726)	6.7	8.65	54	0.0156	6.23	180.20
	2 (6729)	4.3	5.04	5	0.0009	1	18.02
	3 (6731)	1.3	5.30	16	0.0089	3.01	167.24
	MEDIA	4.1±2.7	6.3±2	25±25.7	0.0084±0.0073	3.4±2.6	121.8±90.1
Experimento 2	4 (6705)	8.2	5.22	26	0.0109	4.97	208.32
	5 (6806)	4.4	7.64	34	0.0074	4.45	96.85
	MEDIA	6.3±2.7	6.4±1.7	30±5.6	0.0091±0.0024	4.7±0.3	152.5±78.8
MEDIA TOTAL (n=5)		5±2.6	6.37±1.66	27±18.6	0.0087±0.0053	3.93±2.01	134.13±76.80

Cuantificación realizada en 5 quimeras de hígado fetal trasplantadas mediante el modelo de transferencia en recién nacidos en dos experimentos independientes. Se determina el porcentaje de células PLAP+ en circulación por análisis FACS. Secciones de hígado teñidas con NBT con parches vasculares son cuantificadas por acotamiento zonal de área descrito en materiales y métodos. Primero se calcula el área total de tejido analizado, contamos el número de parches que observamos por quimera y sumamos el área de esos parches. Con estos valores calculamos el número y extensión de área relativa de los parches vasculares. Podemos calcular la media y desviación típica de cada experimento de trasplante ó si las condiciones experimentales son las mismas calculamos la media total de las quimeras.

1.4 Determinación de la repoblación vascular del riñón y corazón.

Para determinar si las células de hígado fetal presentaban capacidad de contribución a la vasculatura y formación de parches vasculares en otros órganos, analizamos la presencia de células donantes SCL-3'Enh-PLAP+ en secciones de riñón y corazón. Todas las quimeras derivadas de trasplantes con células de hígado fetal transferidas a receptores recién nacidos presentaban parches NBT+ en el riñón (6 quimeras de 6) mientras que sólo 2 de 6 presentaban parches en corazón, incluso después de seccionar el corazón por completo (Figura 25) (Tabla 15). También se observan parches NBT+ en riñones de quimeras derivadas de trasplantes con células de hígado fetal transferidas a receptores adultos irradiados, pero en menor frecuencia (Tabla 15). No se observan parches vasculares en el riñón de animales trasplantados con células de médula ósea de adulto.

La señal PLAP+ dispersa en riñones era consistentemente superior en riñones de quimeras de hígado fetal en comparación con quimeras de médula ósea en los dos tipos de trasplantes: en recién nacidos (3,18±1,5% frente a 1,5± 1%, respectivamente, p <0,04) y en adultos irradiados (3.7±2% frente a 1±0.9%, respectivamente). La cuantificación de la señal PLAP+ en el corazón era muy baja, incluso cuando la realizamos de forma no arbitraria en

secciones preseleccionadas por la presencia de señal NBT+ (entre $0,3 \pm 0,02\%$ en quimeras de hígado fetal y $0.23 \pm 0.1\%$ en quimeras de médula ósea).

Estos datos indican que las células de hígado fetal tienen capacidad de formar parches de aspecto vascular PLAP+ en todos los tejidos analizados (hígado, riñón y corazón), mientras que las células de médula ósea no presentan esta capacidad. Además, las células PLAP+ que injertan de forma dispersa en los tejidos, son generalmente más abundantes en las quimeras de hígado fetal que en quimeras de médula ósea independientemente de los tejidos analizados.

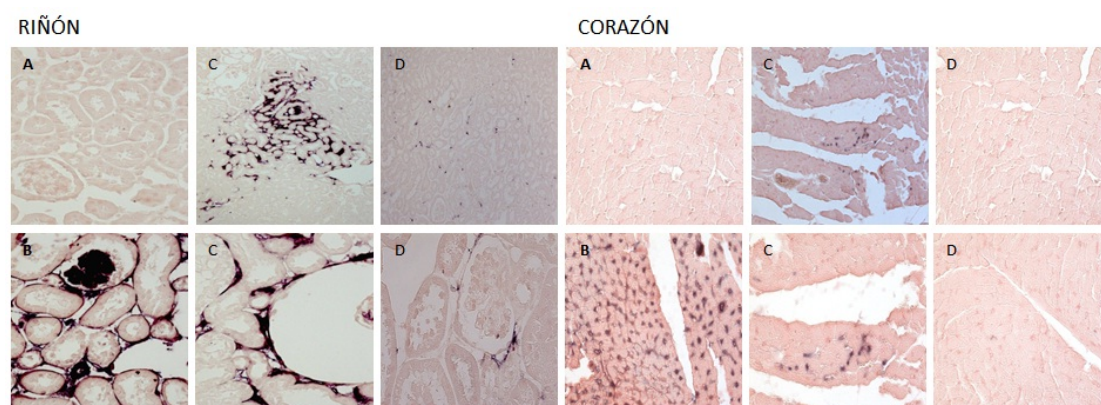


FIGURA 25. Repoblación vascular en riñón (panel izquierdo) y corazón (panel derecho).

Detección de células donantes PLAP+ mediante tinción NBT en secciones. Se muestran secciones de ratones silvestres (A), transgénicos (B) y quimeras de hígado fetal (C) y de médula ósea (D) para cada órgano. Se pueden observar parches de células PLAP+ en riñón y corazón de quimeras de hígado fetal. En quimeras de médula ósea solo se observa señal dispersa. Fotografías tomadas con el microscopio Leica DM5000B a un aumento de 200x (C y D panel superior) y 400x.

Tabla 15. Frecuencia de repoblación vascular en riñón y corazón de quimeras trasplantadas con células de hígado fetal y médula ósea.

Receptor	Células donantes	Quimeras	Riñón		Corazón	
			% Señal PLAP+ dispersa	Frecuencia de parches (**)	% Señal PLAP+ dispersa	Frecuencia de parches (**)
Recién nacido	Hígado fetal	1 (1779)	4.6	++	0.47	+
		2 (1290)	4.5	++	0.49	-
		3 (1399)	3.0	++	0.43	-
		4 (1775)	2.3	++	0.11	+
		5 (1291)	1.5	++	0.53	-
		6 (1293)	2.9	++	0.34	-
		MEDIA (n=6)	3.18±2	(6/6)	0.39±0.2	(2/6)
	Médula ósea	1 (2190)	2.7	-	0.13	-
		2 (2191)	2	-	0.02	-
		3 (1167)	1.9	-	0.63	-
		4 (2188)	0.9	-	0.30	-
		5 (1168)	<0.01	-	0.1	-
		MEDIA (n=5)	1.5±0.2	(0/5)	0.23±0.01	(0/5)
Adulto Irrradiado	Hígado fetal	1 (3468)	1.9	-	NC	NC
		2 (3469)	1.5	-	NC	NC
		3 (2974)	4.8	++	NC	NC
		4 (2977)	4	++	NC	NC
		5 (3456)	6.3	+	NC	NC
		MEDIA (n=5)	3.7±2	(3/5)		
	Médula ósea	1 (2396)	0.18	-	NC	NC
		2 (2266)	0.22	-	NC	NC
		3 (3851)	1.00	-	NC	NC
		4 (3830)	2.6	-	NC	NC
		5 (3835)	0.69	-	NC	NC
		6 (3809)	1.7	-	NC	NC
		MEDIA (n=6)	1.0±0.9	(0/5)		

Secciones de riñón y corazón se tiñen para NBT como muestra en la figura 24. Empleando los métodos de análisis y cuantificación de imagen por threshold se determina la señal dispersa. En secciones no consecutivas realizamos una cuantificación de frecuencia de aparición de parche. (**) Los valores relativos asignados eran: +++ (alta frecuencia), cuando al menos un parche NBT+ era detectado en cada 5-10 secciones; ++ (baja frecuencia), cuando al menos un parche era detectado en cada 10-20 secciones; + (muy baja frecuencia), cuando un parche era detectado al menos una vez; -, cuando no se observaba ningún parche.

NC: no cuantificado

1.4.1 Naturaleza de las células que forman los parches en riñón y corazón.

Para caracterizar las células PLAP+ en riñón y corazón se analizó por inmuno-fluorescencia la co-expresión de CD45, isolectina B4 y CD31 con PLAP. Secciones de riñón de ratones transgénicos contenían tres tipos de células PLAP+: células endoteliales PLAP+CD45-IsoB4+, células hematopoyéticas PLAP+CD45-IsoB4- y células intersticiales PLAP+CD45-IsoB4- (Figura 26A) (Dekel, Metsuyanin et al. 2008). Del mismo modo, los tres tipos de poblaciones celulares fueron identificadas en los parches vasculares derivados de células de hígado fetal trasplantadas (Figura 26A). La naturaleza endotelial de las células Isolectina B4+ fue confirmada por tinción con CD31 realizando un análisis en Z en el confocal. Como se muestra en la figura 26B, PLAP se expresa en el citoplasma de las células que rodean el lumen de los capilares, mientras que CD31 se expresa principalmente en la superficie celular. En las secciones de corazón de las quimeras se observa que la gran mayoría de las células PLAP+ expresan Isolectina B4 y son endoteliales, de forma similar a las células PLAP+ que forman los parches vasculares en el hígado (Figura 26C).

Estos datos demuestran que la composición celular de los parches de aspecto vascular PLAP+ varía dependiendo del órgano. Mientras que el ambiente del hígado y del corazón promueve la diferenciación y expansión de células derivadas de hígado fetal hacia células endoteliales PLAP+CD45-IsoB4+, el riñón proporciona señales para expansión y mantenimiento de progenitores PLAP+CD45-IsoB4-, células endoteliales PLAP+CD45-IsoB4+ y hematopoyéticas PLAP+CD45-IsoB4-.

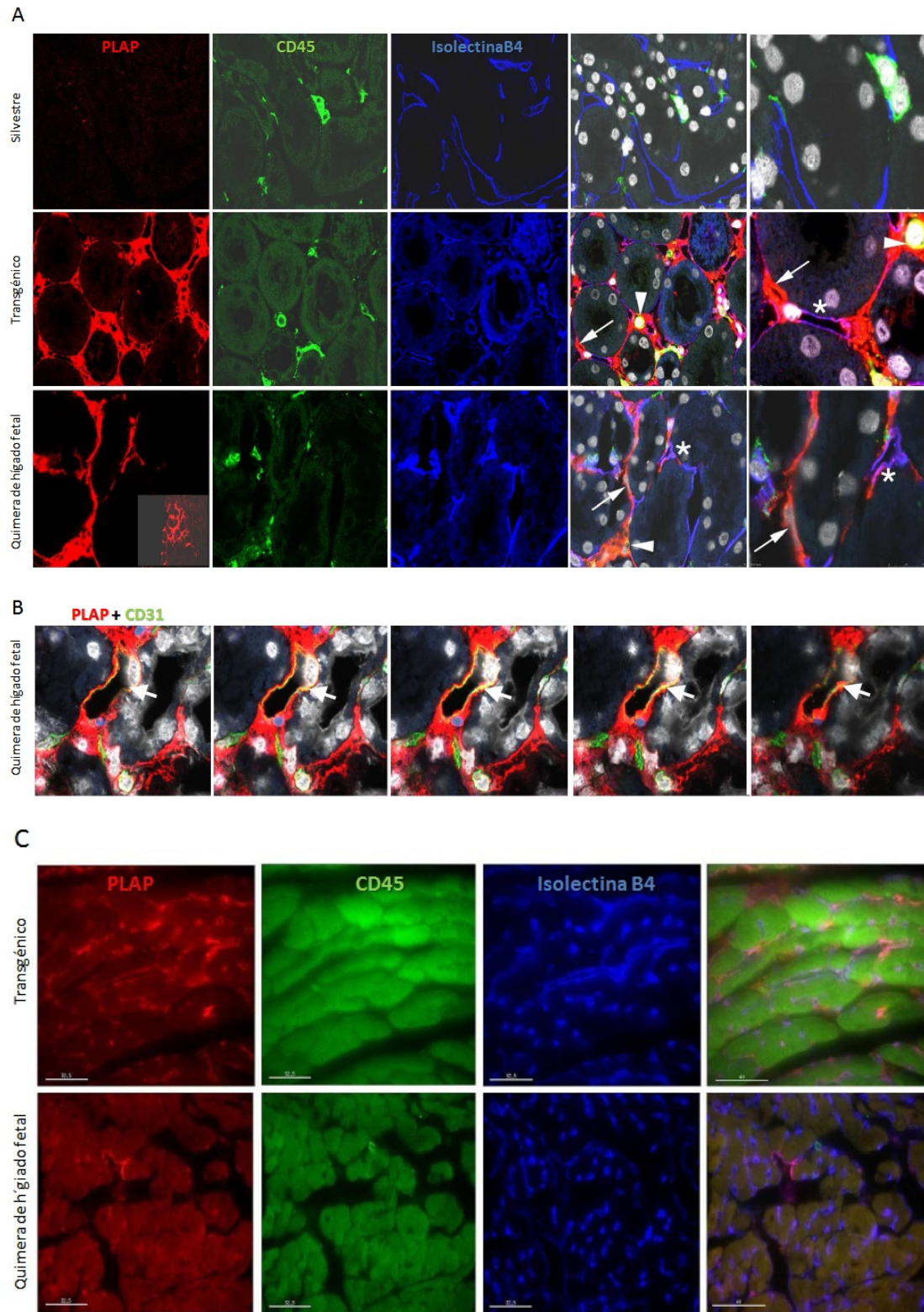


FIGURA 26. Caracterización de células SCL3'Enh-PLAP+ integradas en riñón y corazón.

A. Secciones de riñón de un ratón silvestre (panel superior), de un ratón transgénico (panel medio) y de una quimera trasplantada con hígado fetal (panel inferior) teñidas con anti-PLAP (rojo), anti-CD45 (verde), isolectina B4 (azul) y 4'6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, núcleos grises). En las imágenes con todos los colores se pueden identificar tres tipos celulares en secciones del transgénico y de la quimera: PLAP+CD45-IsoB4- (flecha), PLAP+CD45-IsoB4+ (asterisco), PLAP+CD45-IsoB4- (punta de flecha). **B.** Análisis en Z de secciones de riñón teñidas con anti-PLAP (rojo), anti-CD31 (verde) y

DAPI (gris). Las imágenes seriadas fueron tomadas con un intervalo de 1µm. Se observa co- expresión de PLAP y CD31 en la misma célula (flecha). C. Imágenes de secciones de corazón de un ratón transgénico (panel superior) y de una quimera de hígado fetal (panel inferior) teñidos con anti-PLAP (rojo), anti-CD45 (verde), e Isolectina B4 (azul). Imágenes de A y B fueron tomadas con el microscopio confocal Leica DM2500/TCS SPE. Las imágenes de C con el microscopio Olympus IX-71 con el sistema Delta Vision.

1.4.2 Caracterización fenotípica de las células PLAP+CD45-IsoB4- en el riñón de quimeras de hígado fetal.

Trabajos previos del grupo sugerían que células SCL3'EnhPLAP+ intra-renales podrían representar progenitores hemangioblásticos o angioblásticos CD34+. En trasplantes se demostraba que podían derivar de médula ósea y además presentaban una respuesta proliferativa durante un daño isquémico reversible (Dekel, Metsuyanin et al. 2008). Para una mayor caracterización fenotípica de células PLAP+CD45-IsoB4- derivadas de hígado fetal teñimos secciones de riñón para detectar la expresión de CD34, un marcador presente en células madre de hígado fetal (Sanchez, Holmes et al. 1996), en progenitores endoteliales (Asahara, Murohara et al. 1997), y en células endoteliales maduras, aunque a bajos niveles (Lin, Finger et al. 1995). Mientras que la expresión de CD34 es muy baja en la mayoría de las células PLAP+CD45-IsoB4+ asociadas a endotelio en ratones transgénicos (Figura 27A, panel superior), esta señal es muy alta en las células intersticiales presentes en los parches vasculares de quimeras de hígado fetal (Figura 27A, panel medio). Imágenes tomadas a alto aumento muestran claramente que células PLAP+CD45-IsoB4- expresan altos niveles de CD34, sugiriendo su naturaleza hemangioblástica o angioblástica (Figura 27A, panel inferior). Además, hemos analizado si las células intersticiales PLAP+ pueden estar relacionadas con células progenitoras mieloides o musculares, que también expresan el vector SCL3'Enh (Sanchez, Gottgens et al. 1999; Pimanda, Silberstein et al. 2006). La tinción de secciones de riñón con α -actina, PLAP, CD45 e IsoB4 demuestran que las células PLAP+ no co- expresan α -actina en el riñón de quimeras (Figura 27B), excluyendo así un linaje de músculo liso. Analizamos también la expresión del marcador F4/80 asociado a un linaje mieloides. Una minoría de células PLAP+CD45/IsoB4+ co- expresaban este marcador, pero ninguna expresión fue detectada en las células PLAP+CD45/IsoB4- (Figura 27C). Estos datos están de acuerdo con la existencia de un progenitor con naturaleza PLAP+CD45-IsoB4- CD34+ presente en el riñón, cuya función podría estar asociada con reparación vascular (Dekel, Metsuyanin et al. 2008). Se necesitaría una extensa caracterización genotípica y funcional

para determinar la naturaleza y propiedades de interacción de esta población con nichos hemato-vasculares presentes en el riñón.

Por tanto, estos experimentos muestran que células PLAP+CD45-IsoB4- expresan altos niveles de CD34 y son negativas para marcadores musculares (α -SMA) y mieloides (F4/80), sugiriendo una naturaleza hemangioblástica.

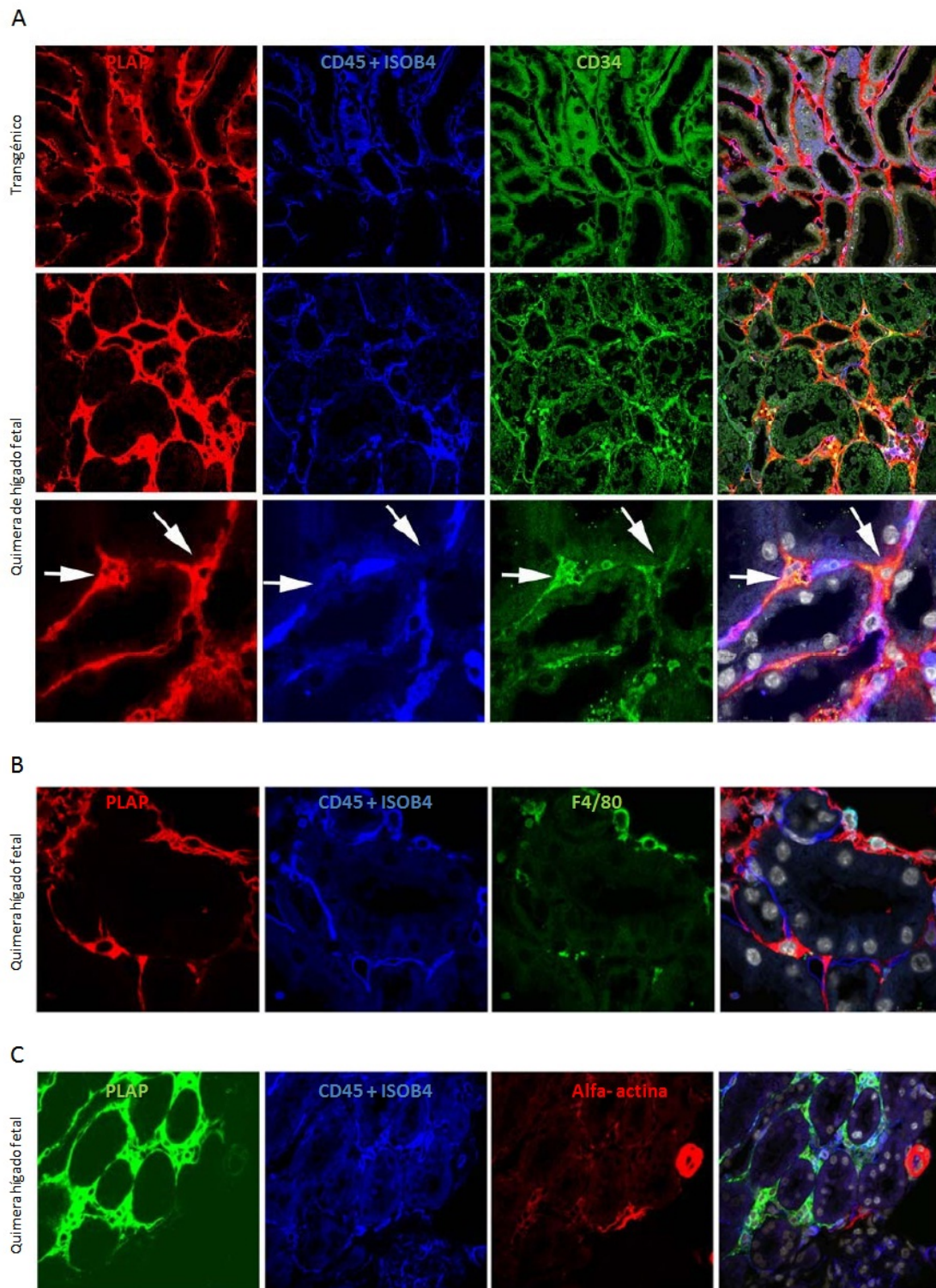


FIGURA 27. Las células PLAP+CD45-IsoB4- de los parches en riñón expresan altos niveles de marcadores de progenitores hemato-vasculares.

A. Secciones de riñón de ratones transgénicos SCL3'Enh (panel superior) y de quimeras de hígado fetal (panel medio e inferior) teñidos para los anticuerpos anti-PLAP (rojo), anti-CD34 (verde), anti-CD45 e IsoB4 (azul) y DAPI (en gris para los núcleos). CD34 se expresa de forma muy débil en el endotelio micro vascular alrededor de los túbulos renales en ratones transgénicos (panel superior). Fuerte expresión de CD34 se observa en parches PLAP+ de riñones derivados de quimeras de hígado fetal SCL3'Enh-PLAP (panel medio). Imágenes a mayor aumento muestran que la mayoría de las células PLAP+CD45-IsoB4- expresan CD34 (flechas, panel inferior). B. Tinción con anti-PLAP (verde), anti α - actina del músculo liso (rojo), y anti-CD45 e IsoB4 (azul); y C. Tinción con anti-PLAP (rojo), anti F4/80 (verde), y anti CD45 e IsoB4 (azul), muestran que la mayoría de las células PLAP+ no expresan altos niveles del antígeno α -actina del músculo liso o del antígeno asociado a células mieloides F4/80. Imágenes adquiridas con el microscopio confocal Leica DM2500/TCS SPE.

1.4.3 Caracterización funcional hematopoyética de células PLAP+ de riñón.

Teniendo en cuenta que otros trabajos habían puesto de manifiesto la existencia de progenitores y células madre hematopoyéticas asociados a nichos extra-medulares, incluyendo el riñón (Kiel, Yilmaz et al. 2005; Grunewald, Avraham et al. 2006), decidimos testar la capacidad hematopoyética de las células PLAP+ en el riñón de quimeras de hígado fetal. La suspensión celular del riñón se obtuvo por tratamiento por colagenasa como previamente el grupo había publicado (Dekel, Metsuyanin et al. 2008) (aproximadamente 100×10^6 células/ riñón). Por citometría de flujo se determinó dentro de la población PLAP+ el porcentaje de células hematopoyéticas (CD45+), de células progenitoras (cKit+) y de células (CD31+), marcador asociado a endotelio. En el riñón de animales transgénicos un 6% de células expresaban PLAP+, de las cuales la gran mayoría es CD31+ (3%). Una minoría presentaba CD45 (0.3%) y otra fracción expresaba c-Kit+ (Figura 28). En quimeras hematopoyéticas de hígado fetal el porcentajes de células de riñón PLAP+ era de $(1,02 \pm 0.6\%)$ y más de la mitad co-expresa CD45 (0.6%). Sin embargo, solo una pequeña fracción expresan el marcador de progenitores cKit (Figura 28, Tabla 16).

Para testar la actividad progenitora hematopoyética de las células PLAP+ localizadas en el riñón realizamos experimentos de repoblación hematopoyética a largo tiempo. Se realizaron dos experimentos de trasplante con células de riñón de animales transgénicos SCL3'Enh-PLAP y uno con células de una quimera. Se trasplantaron células sin fraccionar y fraccionadas PLAP+. Como control se trasplantaron células de médula ósea de la quimera sin fraccionar y la fracción PLAP+. De los 33 animales trasplantados con células de riñón, solo 17 sobrevivieron más de 5 semanas. Ninguno presentaba repoblación hematopoyética en

sangre. Sin embargo, 2 de los 7 animales trasplantados con células de médula ósea de la quimera presentaban injerto hematopoyético. Por tanto, estos datos sugieren que en el riñón las células PLAP+ no incluyen células madre hematopoyéticas (Tabla 17).

Para determinar si células de riñón PLAP+ contenían progenitores capaces de generar Unidades Formadoras de Colonias (CFU-S) se realizaron ensayos de formación de colonias in vitro sobre medio semi-sólido de metil-celulosa suplementado con citoquinas pro-eritroides-mielode. Como control se emplearon células de médula ósea de la quimera. Células no fraccionadas y células PLAP+ de médula ósea y riñón se cultivaron durante 7 días y bajo la lupa se determinó el número de colonias (Tabla 18). A los 14 días se tomaron fotos de las diferentes colonias y determinó el genotipo por PCR-PLAP. La gran mayoría de las colonias de riñón presentaban una morfología no hematopoyética (Figura 29). Solo se obtuvieron 7 pequeñas colonias de tipo hematopoyético de la fracción de riñón PLAP+, de las cuales se pudo comprobar que dos eran PLAP+ por PCR y por tanto, derivaban del donante. La frecuencia de colonias en riñón resultaba 500 veces menor que la determinada en células PLAP+ de médula ósea (Tabla 18). Además, mientras que las colonias de médula ósea eran en general grandes y compuestas de diferentes tipos celulares (tipo CFU-Mixto, progenitores mieloides inmaduros), las colonias de riñón son pequeñas y de un solo tipo celular (Figura 29). Por tanto, según los ensayos mostrados, la capacidad de las células de riñón de tipo PLAP+ como progenitor hematopoyético es muy reducida o nula. La mayoría de estas células de riñón PLAP+CD45+ son probablemente células hematopoyéticas efectoras maduras. Sigue quedando por determinar la naturaleza de la pequeña fracción de células PLAP+ cKit+ (y probablemente CD34+).

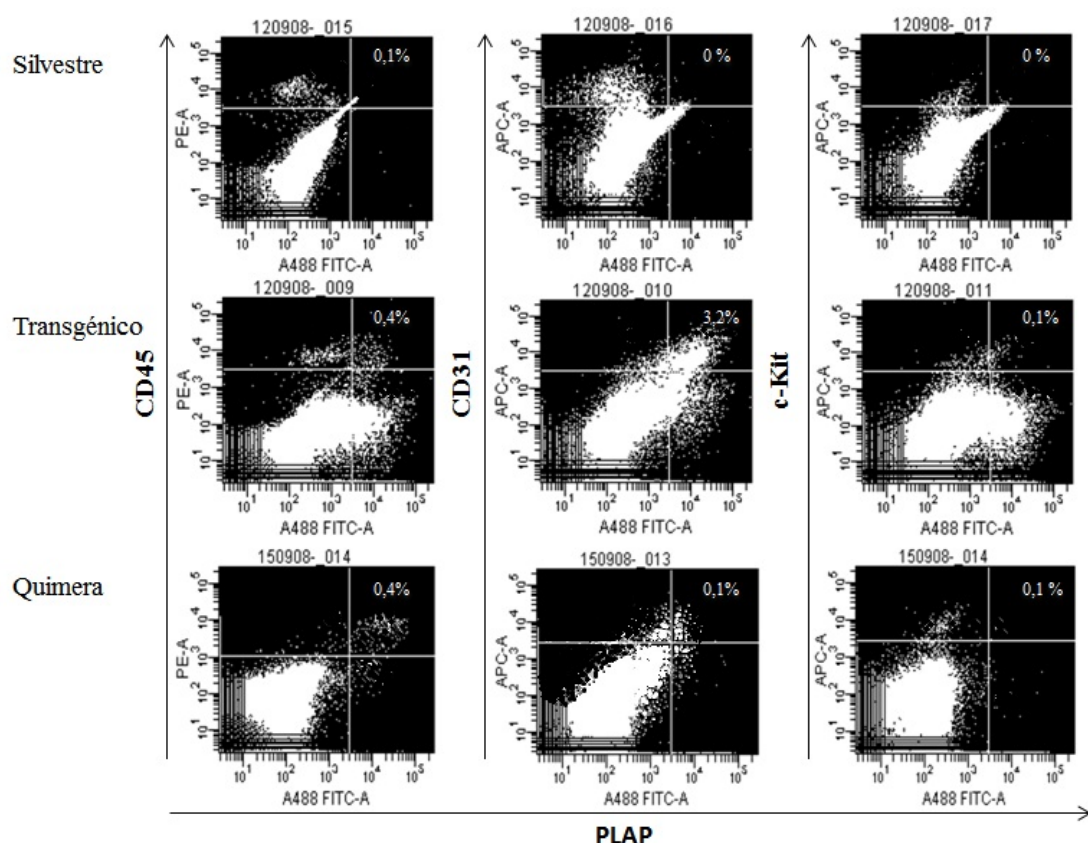


FIGURA 28. Caracterización fenotípica de células de riñón.

Una suspensión de célula de riñón de ratones silvestres, transgénicos y quimeras trasplantada con células de hígado fetal fue analizada por citometría de flujo para la expresión de PLAP (en FITC) y el marcador indicado en vertical (CD45, CD31 y cKit). En el transgénico la mayoría de las células expresan el marcador de endotelio CD31; mientras que la quimera más de la mitad de células PLAP+ co-expresan CD45. Los cuadrantes de cada población fueron establecidos en base a la tinción con el silvestre y la tinción con anticuerpos secundarios, y la compensación de colores individuales

TABLA 16. Análisis fenotípico de expresión de diferentes marcadores por FACS en células de riñón, sangre y médula ósea.

Tipo de animal	Órgano	Porcentaje de células medido por FACS			
		PLAP+	PLAP+CD45+	PLAP+CD31+	PLAP+cKit+
Transgénico (n=6)	Riñón	6,26±2	0,3± 0,2	3.1± 0,8	0,1±0
Quimera de hígado fetal (n=5)	Riñón	1,02±0,6	0,64± 0,43	0,1± 0,1	0,03± 0,04
	Sangre	8,3± 3,6	8,15± 3,7	1,1± 1,5	0,2± 0,14
	Médula ósea	5,2± 2,6	4,9± 2,2	1,2± 0,8	2,3± 1,4

TABLA 17. Repoblación hematopoyética en quimeras trasplantadas con células de riñón

Tipo de animal	Célula donante	Nº células trasplantadas	Nº animales recién nacidos trasplantados	Nº animales PCR-PLAP+ en sangre/ Nº supervivientes
Transgénico SCL3'EnhPLAP	Riñón total	5x10 ⁶	6	0/6
	Riñón PLAP+	87000	8	0/1
	Riñón PLAP-	230000	6	0/4
Quimera de hígado fetal	Riñón total	5x10 ⁶	9	0/5
	Riñón PLAP+	25000	2	0/0
	Riñón PLAP-	140000	2	0/1
	Médula ósea total	5x10 ⁶	5	1/5
	Médula ósea PLAP+	5000	3	1/3

TABLA 18. Cuantificación de colonias generadas por células de riñón y médula ósea de una quimera de hígado fetal

Tejido	Tipo de célula	Nº células/ Placa (x10 ⁴)	Nº Colonias día 7	Tipo de Colonia	PCR de 10 colonias
Riñón	Total	50	0	>10 no hem	0: PLAP+
	PLAP+	0.42	7	5 hem	2 hem: PLAP+
				2 no hem	2 no hem: PLAP-
	PLAP-	220	2	2 no hem	Todas PLAP-
Médula ósea	Total	5	137	137 hem	10: PLAP+
	PLAP+	0.16	395	395 hem	5: PLAP+
	PLAP-	50	30	30 hem	4: PLAP+ 3: PLAP-

Quimera de hígado fetal con un porcentaje PLAP+ en sangre periférica medido por FACS de 13.8% y en riñón de 1,8%.

Colonias generadas a los 7 días de cultivo en Methocult

hem: colonia hematopoyéticas

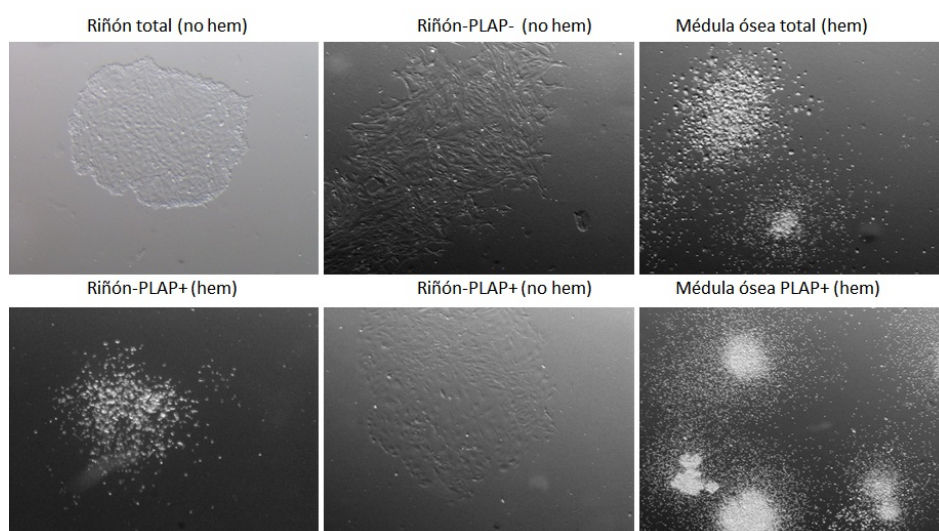


FIGURA 29. UFC-S en riñón y médula ósea.

Se muestran fotos de colonias obtenidas con el cultivo de células de riñón no fraccionado, fraccionado para PLAP- y para PLAP+; así como colonias controles del cultivo de células de médula ósea no fraccionada y fraccionada para PLAP+. Células progenitoras con capacidad de generar unidades formadoras de colonias hematopoyéticas (hem) se obtienen de células fraccionadas (PLAP+) en riñón y en médula ósea. Con células no fraccionadas (total) o fraccionadas (PLAP- y PLAP+) de riñón se producen colonias con una morfología y un genotipo no hematopoyético (no hem) determinado PCR-PLAP a los 14 días después del cultivo en Methocult.

1.5 Determinación de la capacidad de repoblación de hepatocitos de células de hígado fetal trasplantadas en recién nacidos

El hígado de embriones de ratón de día 12 de desarrollo está compuesto por diferentes tipos de células, mayoritariamente de linaje hematopoyético, incluyendo células madre. También contiene precursores de hepatocitos capaces de repoblar el parénquima hepático, como han puesto de manifiesto experimentos de trasplantes de animales adultos previamente hepatectomizados y tratados con retosina (Oertel, Menthena et al. 2007). Para determinar si nuestro sistema de trasplantes en recién nacido permitía la repoblación hepática, y por tanto la obtención de parches "hepato-vasculares", realizamos trasplantes en recién nacidos de células de hígado fetal empleando donantes con marcadores genéticos de detección ubicua. Se emplearon dos sistemas, el marcador cromosómico Y y el vector de expresión en transgénicos actina-Dsred. Los donantes también eran transgénicos para el marcador específico hemato vascular SCL3'EnhPLAP (donantes SCL3'EnhPLAP machos - trasplantados en hembras- (sistema PLAP; Y) y donantes SCL3'EnhPLAP; actina-Dsred (sistema PLAP; DsRed)).

1.5.1 Determinación de repoblación de parénquima hepático en trasplantes de células fetales mediante determinación de marcadores cromosómicos Y/X por Hibridación in situ

Realizamos la detección del cromosoma Y mediante la técnica FISH en ratones receptores hembra que presentaban alto quimerismo hematopoyético macho, determinado por PCR-Y semicuantitativa en sangre y órganos hematopoyéticos (Figura 30A). De las 5 hembras receptoras seleccionadas, elegimos 2 con alto número de parches PLAP+ en secciones de hígado. Asumimos que los parches vasculares podrían ser también zonas de alta integración hepática. Se seleccionaron secciones que presentaban entre 5-7 parches detectados por tinción con DAB-PLAP (Figura 30B). En secciones seriadas se analizaba la presencia del marcador Y por FISH. En secciones de hígado procedente de controles (machos; SCL3'EnhPLAP) la señal Y+ fue detectada aproximadamente en el 85% de los núcleos de hepatocitos y ninguna señal era detectada en hembras controles (Figura 30C). Mientras que los núcleos de los hepatocitos son grandes con nucléolos prominentes, los núcleos de las células endoteliales microvasculares apenas aparecen en las preparaciones, impidiendo determinar la presencia del marcador Y. De un total de 14 zonas con parches vasculares analizadas, cada una conteniendo entre 40 a 60 núcleos de hepatocitos, anotamos 3 hepatocitos Y+ en dos parches vasculares diferentes (Figura 30C).

Estos datos indicaban que las células derivadas de hígado fetal contribuían de forma esporádica a los hepatocitos y no se correlacionaba la presencia de hepatocitos donantes con la aparición de parches vasculares en nuestro sistema de trasplante.

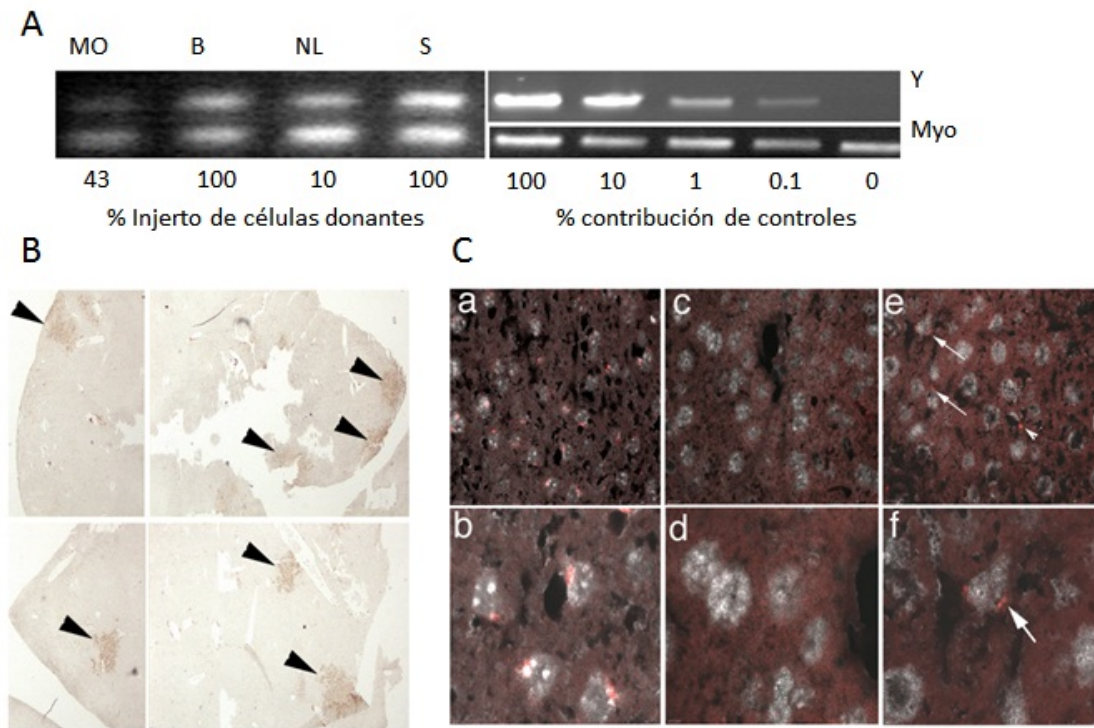


FIGURA 30. Análisis de repoblación hepática con el marcador cromosómico Y.

A. PCR semicuantitativa para Y. En quimeras hembras con quimerismo hematopoyético macho en sangre periférica realizamos PCR semicuantitativa para determinar el porcentaje de injerto en los demás órganos hematopoyéticos (médula ósea, timo, bazo, nódulos linfáticos y sangre). Los controles para determinar el porcentaje de contribución de las células donantes se generaron por diluciones de DNA macho en DNA hembra indicado como 100%, 10%, 1% y 0%. El porcentaje de contribución de cada muestra de órganos hematopoyéticos está indicado debajo de cada línea. **B.** Secciones de hígado seriadas se tiñeron para DAB-PLAP. Se tomaron imágenes a bajo aumento (25x) para generar un mapa con los puntos de localización de las áreas que contienen parches. **C.** Secciones de hígado de controles macho y hembra, y de quimera de hígado fetal fueron sometidas a Y-FISH. Dos experimentos independientes fueron analizados. La señal del cromosoma Y fue detectada en el macho control (a y b) y ninguna señal fue detectada en la hembra control (c y d). En el análisis de parches PLAP+ se observaron 3 hepatocitos Y+ en una quimera. El área que contiene dos hepatocitos Y+ se muestra en la figura (e y f, flechas). La otra señal Y+ podría corresponder con una célula endotelial o hematopoyética (e, punta de flecha). Las figuras de B fueron tomadas de microscopio Leica DL5000. Las figuras de C en el microscopio de fluorescencia confocal, Leica SPE. (a, c, d a un aumento de 400x; b, d y f a 630x).

1.5.2 Determinación de repoblación de parénquima hepático en trasplantes de células fetales derivadas de donantes transgénicos para el vector de expresión ubicua actina-Dsred.

En el sistema de trasplante anterior, las células donantes fetales tienen un origen mixto macho: hembra, ya que no podemos seleccionar el sexo de los embriones antes del trasplante. Aunque las quimeras son seleccionadas por su alto quimerismo hematopoyético-Y, no podemos excluir totalmente que en el hígado la integración también sea de células de tipo hembra XX y estemos infravalorando la presencia de células donantes. Para intentar evaluar este aspecto empleamos otro sistema de trasplante utilizando donantes transgénicos para el marcador de expresión ubicua actina-DsRed.

Ratones transgénicos DsRed se cruzaron con los ratones transgénicos para SCL3'Enh-hPLAP. Seleccionamos embriones DsRed positivos, bajo la lupa de fluorescencia, y PLAP positivos, mediante tinción NBT del saco vitelino, ambos métodos eficientes y rápidos (Figura 31A). En algunos casos, el fenotipo de los embriones transgénicos se confirma por análisis de FACS para la expresión de DsRed y PLAP en las células de hígado (Figura 31B). Posteriormente confirmamos este resultado por PCR para PLAP y DsRed.

Las células del hígado de embriones seleccionados se transfieren a ratones recién nacidos, y a los 5 meses las analizamos por citometría de flujo determinado el nivel de expresión PLAP/DsRed en sangre periférica (Figura 31C). La frecuencia de quimerismo hematopoyético es del 100% (10 quimeras hematopoyéticas de 10 trasplantadas). Además todas son de alto nivel de contribución (aproximadamente el 90% de señal DsRed en sangre) (Tabla 19). Observamos que todas las células PLAP+ de la sangre expresan el marcador DsRed.

En crio-secciones del hígado de las quimeras comprobamos la formación de parches vasculares por tinción con NBT en todos los individuos. A continuación, en secciones contiguas, determinamos la presencia de parches vasculares y hepatocitos DsRed+.

El análisis de secciones de transgénicos PLAP; DsRed muestra la expresión de DsRed en todos los hepatocitos (rojo) y PLAP (verde) en toda la red vascular (Figura 32A). En estos controles es difícil observar la expresión de DsRed en la vasculatura debido a la baja intensidad de expresión comparativamente con los hepatocitos. En las quimeras podemos observar células DsRed formando parches vasculares, alrededor de los espacios portales (Figura 32B) y dispersas por el parénquima. Algunas de estas células son hepatocitos como se observa en la figura 32B (panel inferior). En el caso de parches vasculares y células

asociadas a espacios portales la mayoría de las células co-expresan PLAP, encontrando alguna solamente DsRed.

Estos datos confirman los obtenidos por análisis FISH-Y/PLAP, e indican que nuestro sistema de trasplante es selectivo para la repoblación hematopoyética y vascular, pero no permite la repoblación hepática, solo la integración esporádica de hepatocitos. La repoblación hepática probablemente necesite la depleción o el bloqueo efectivo de la proliferación de los hepatocitos endógenos previo al injerto de progenitores donantes, como otros grupos han puesto de manifiesto (Oertel, Menthena et al. 2007). Por tanto, el tratamiento con busulfán no es eficaz para visualizar la actividad de repoblación hepática de estos progenitores.

Es importante resaltar, que aunque el sistema de expresión ubicua DsRed para seguimiento de linaje celular derivado de donante en trasplantes también permite detectar parches vasculares, presenta diversas desventajas respecto al sistema de detección por PLAP. Primero, el nivel de detección por fluorescencia y análisis confocal es mucho menos sensible para DsRed que para PLAP. En segundo lugar, con el sistema DsRed, la detección se realiza en secciones de criostato, mas complicadas de preservar. Además, la detección de PLAP por tinción con NBT, presenta grandes ventajas en rapidez, economía y conservación para cuantificaciones. Por ello los experimentos que siguen se emplean principalmente el sistema de seguimiento en trasplantes por detección de PLAP.

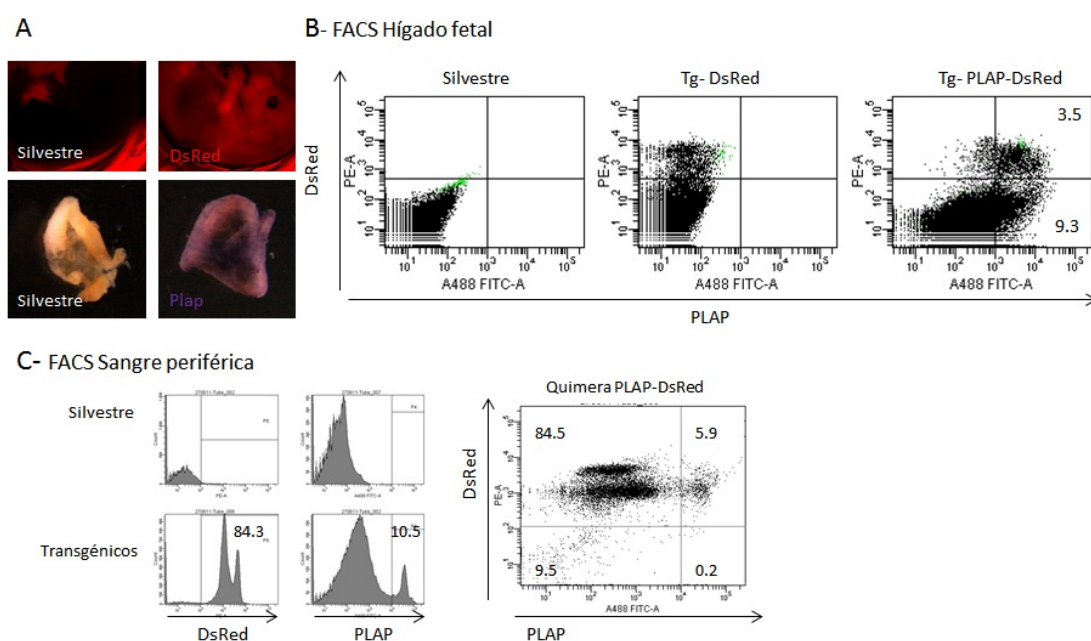


FIGURA 31. Expresión de marcadores DsRed-PLAP.

A. Selección de embriones: Bajo la lupa de fluorescencia detectamos la proteína fluorescente roja que emiten los ratones transgénicos DsRed, seleccionamos aquellos que sean rojos y teñimos su saco vitelino con NBT para determinar cuál es PLAP. La figura muestra un embrión silvestre y otro DsRed, y un saco vitelino silvestre y otro transgénico para PLAP. B. Caracterización de células de hígado fetal DsRed-PLAP por citometría de flujo. Se muestran los gráficos de células de hígado fetal teñidas para anti-PLAP y Alexa Fluo-488 de un ratón silvestre, un transgénico para DsRed y un doble transgénico PLAP-DsRed. C. Análisis de repoblación hematopoyética por citometría de flujo de células de sangre periférica de quimeras PLAP-DsRed. Los histogramas muestran tinción DsRed y PLAP de células de un ratón silvestre y de un ratón transgénico. El gráfico muestra co-expresión de ambos marcadores en la sangre periférica de la quimera.

TABLA 19. Frecuencia de repoblación hematopoyética en trasplantes de hígado fetal DsRed -SCL3'EnhPLAP.

Receptor	Células donantes	Nº de células/receptor	Nº ratones PLAP+DsRed+ en sangre/Nº ratones trasplantados	%FACS-PLAP+DsRed+	% FACS DsRed+
Recién Nacido	Hígado fetal DsRed-SCL3'EnhPLAP	⁶ 10	10/10	8,05±2,7	88,85±2,1

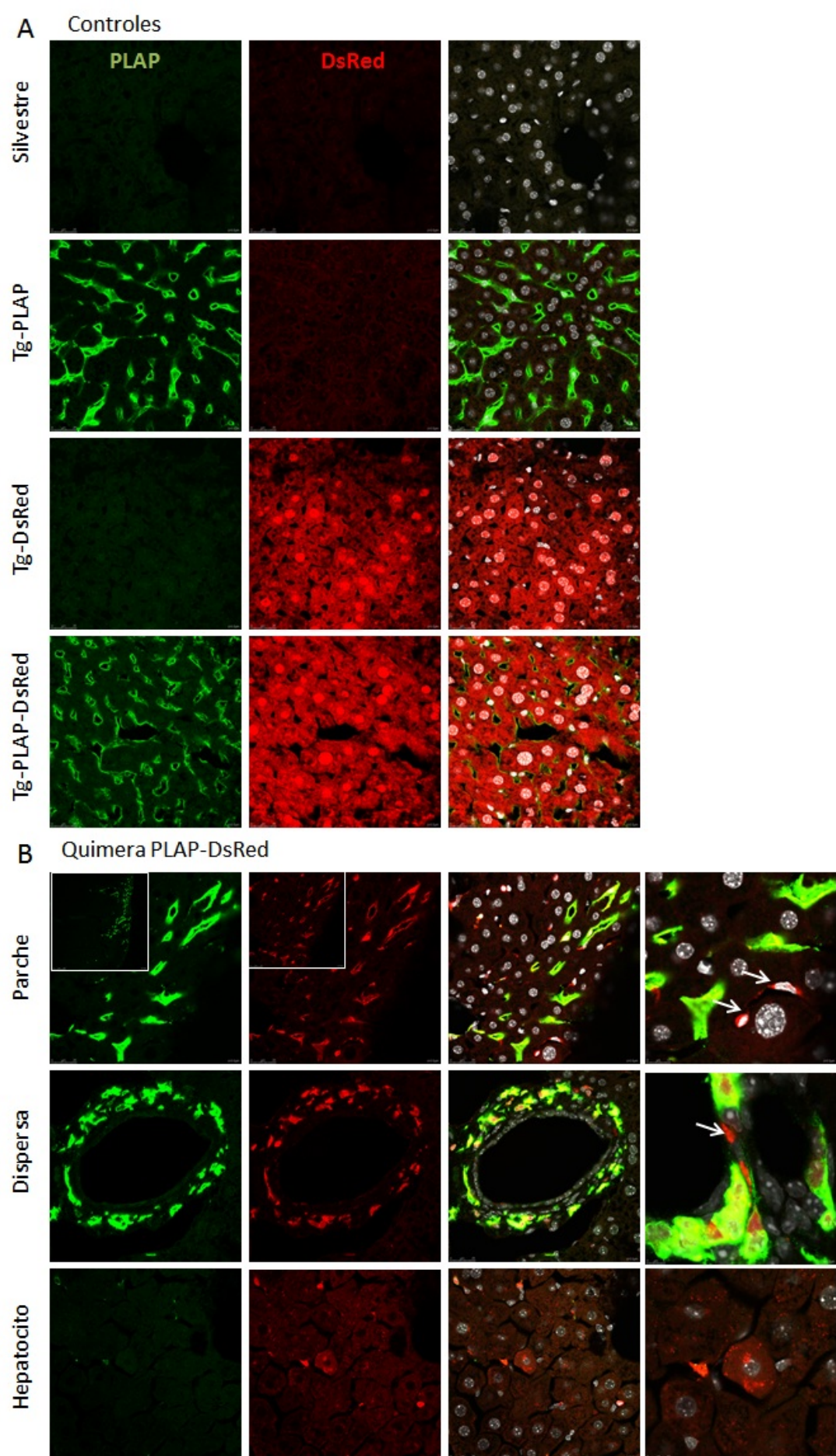


FIGURA 32. Análisis de repoblación hemato-vascular y hepática con el vector de expresión actina-DsRed y SCL3'EnhPLAP.

A. Secciones de hígado de controles teñidas para PLAP y DAPI de un ratón: silvestre, donde no se observa ninguna expresión Plap o DsRed; Transgénico para SCL3'Enh-PLAP, donde se observa expresión en verde de PLAP en el sistema vascular; Transgénico para DsRed cuyos hepatocitos expresan la proteína fluorescente roja; Transgénico PLAP-DsRed donde se observan ambos colores. B. Secciones de quimera PLAP-DsRed. Encontramos células PLAP+DsRed+ que forman estructuras de parches y otras que se disponen alrededor de los vasos. La mayoría de las células PLAP expresan DsRed, pero hay algunas células que solo expresan DsRed (fecha). Podemos observar algún hepatocito derivado del donante DsRed positivo, negativo para PLAP. Imágenes tomadas con un microscopio confocal Leica DM2500/TCS SPE usando un software LAS AF equipado con los laser 488 y DsRed y a magnificación 100x, 400x y 630x

2. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y FUNCIONAL DE LOS PRECURSORES HEMATO-VASCULARES EN EL HÍGADO FETAL.

Como se muestra en el apartado anterior, las células de hígado fetal obtenidas del estadio embrionario de día 12 tienen alto potencial de diferenciación a endotelio vascular en trasplantes. En este apartado se exponen los experimentos realizados para caracterizar la población o poblaciones con potencial vascular y determinar su relación con el linaje hematopoyético. La estrategia general consiste en aislar poblaciones por citometría de flujo, en base a la expresión de marcadores hemato- vasculares, y determinar, en trasplantes en recién nacidos, su potencial de contribución a la vasculatura hepática. En el último apartado se discutirá la contribución vascular en riñón y corazón en algunos tipos de quimeras.

2.1. Caracterización fenotípica de las células de hígado fetal de día 12 por citometría de flujo.

Experimentos previos del grupo demostraron que la población de hígado fetal que expresa el vector SCL3'Enh contiene la gran mayoría de los progenitores y células madre hematopoyéticas (CMHs) cKit+ y CD34+ (Sanchez, Gottgens et al. 1999; Sanchez, Bockamp et al. 2001; Silberstein, Sanchez et al. 2005). Para analizar la presencia de precursores endoteliales hemos determinado por citometría de flujo la expresión de marcadores clásicamente asociados a vasculatura en la población SCL3'Enh-PLAP^{brillante} (denominada PLAP+): CD31, CD34, Flk-1, Tie-2 y VE-Cadherina (Figura 33). Este análisis confirma que un 30-50% de la población PLAP+ expresa esos marcadores. En general, estos receptores son compartidos por progenitores hematopoyéticos y también se expresan en CMHs. En particular, la expresión de VE-Cadherina se ha asociado a progenitores hemangioblásticos y endotelio hemogéneo así como a CMHs en el AGM, en el hígado fetal y en el saco vitelino (Nishikawa, Nishikawa et al. 1998; Taoudi, Morrison et al. 2005).

El análisis fenotípico tri-color por FACS de las células PLAP+VE-Cadherina+ de hígado fetal pone de manifiesto la expresión de marcadores hematopoyéticos (CD45), marcadores de progenitores (cKit) e incluso de marcadores potencialmente asociados a células mesenquimales (CD44). Así mismo, las células VE-Cadherina+ expresan moléculas asociadas a endotelio (CD31, CD34 y Flk-1), que pueden representar un tipo de células endoteliales más maduras (Taoudi, Morrison et al. 2005). También expresan Sca-1, un marcador asociado a progenitores endoteliales de hígado fetal con alta capacidad de proliferación in vitro

(Cherqui, Kurian et al. 2006) (Figura 34). Descartamos la presencia de progenitores hepáticos en la población PLAP+VE-Cadherina+ considerando que éstos no expresan marcadores hematopoyéticos (CD45, Ter119), marcadores vasculares (VE-Cad, CD31) ni marcadores cKit o CD34 (Nierhoff, Ogawa et al. 2005). La fracción de células PLAP- contiene baja frecuencia de células VE-Cadherina+ tanto para marcadores hematopoyéticos como para los endoteliales, además esta población negativa no contiene la población VE-Cad+Sca1+. La población PLAP- contiene mayoritariamente células eritroides Ter119+ y posiblemente hepatoblastos (Figura 34).

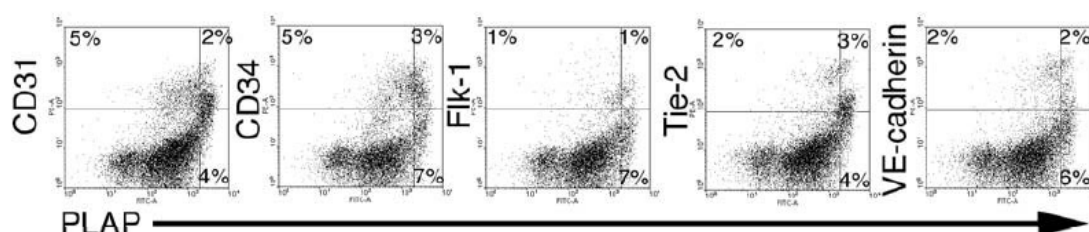


FIGURA 33. Expresión de marcadores endoteliales en la población de hígado fetal PLAP^{brillante} (denominada PLAP+).

Análisis por citometría de flujo se realizó con células de hígado fetal teñidas para PLAP (FITC) y el marcador indicado en vertical (PE). Una fracción considerable de las células PLAP+ expresan los marcadores asociados a endotelio indicados. Los cuadrantes de cada población fueron establecidos en base a la tinción con el silvestre y la tinción con anticuerpos secundarios, y la compensación de colores individuales.

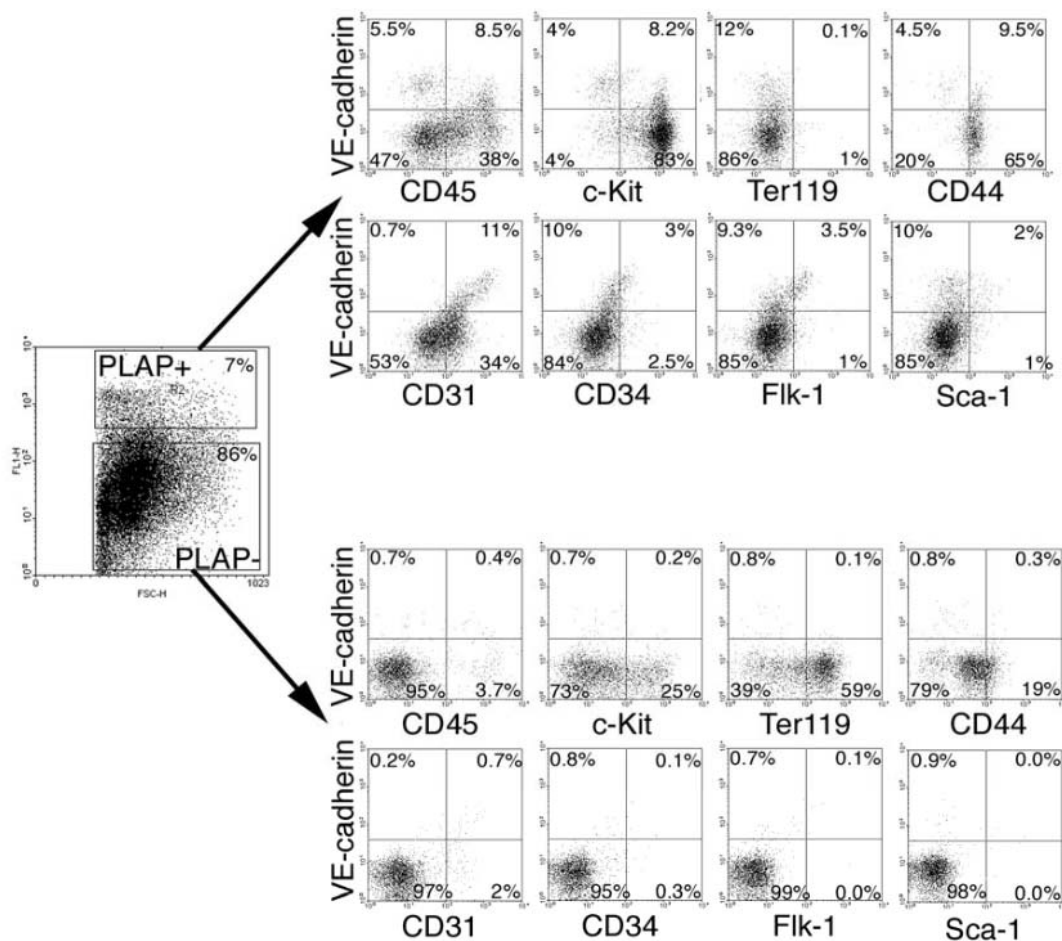


FIGURA 34. Análisis fenotípico comparativo de la población de células de hígado fetal PLAP+ y PLAP-.

La suspensión de células de hígado fetal de día 12 de embriones transgénicos y no transgénicos (como control) fue analizada por citometría de flujo multicolor. La triple tinción mostrada fue realizada con anticuerpos para PLAP (no conjugado), para VE-Cadherina conjugado con biotina, y el resto de anticuerpos específicos para células hematopoyéticas, endoteliales y progenitores conjugados con ficoeritrina (PE); seguido de la tinción con los secundarios Alexa Fluo 488 goat anti rabbit y estreptavidina Cy5. Se muestra un gráfico que representa la población total de células de hígado fetal transgénicas teñidas para el marcador PLAP, las dos ventanas delimitan las poblaciones PLAP+ y PLAP-. Dentro de estas dos poblaciones se analizan el resto de marcadores. Dentro de la población PLAP+ hay un incremento en la frecuencia de progenitores hematopoyéticos (VE-Cad+CD45+, VE-Cad+cKit+) y progenitores endoteliales (VE-Cad+ CD31+, VE-Cad+CD34+, VE-Cad+Flk1+, y VE-Cad+Sca-1+). Se representan los datos de un experimento. Para cada marcador, entre 3 y 6 experimentos independientes fueron realizados

2.2 Potencial de diferenciación hemato-vascular en trasplantes de diferentes poblaciones celulares

2.2.1 Las células SCL3'Enh PLAP+ contienen actividad vascular y hematopoyética en trasplantes

Para demostrar si las células de hígado fetal SCL3'Enh- PLAP+ tienen potencial de contribuir a la vasculatura y generar parches vasculares endoteliales seleccionamos esa población mediante citometría de flujo y la trasplantamos en ratones recién nacidos tratados con busulfán. Otro grupo de ratones se trasplantaron con las células SCL3'Enh-PLAP- para evitar excluir alguna población de células con actividad vascular. El número de células trasplantadas por individuo fue de $2 - 6 \times 10^4$ PLAP+ y $6 - 500 \times 10^4$ PLAP- que corresponde a un número de embriones equivalentes de 2.4 a 4 y de 0.8 a 2.6, respectivamente, como muestra la tabla 20.

El análisis del quimerismo hematopoyético indicaba que 7 de 14 animales trasplantados con las células PLAP+ presentaban quimerismo hematopoyético a largo plazo en sangre (entre 1-29.5% de células donantes FACS-PLAP+ en sangre) y órganos hematopoyéticos determinado por PCR-PLAP (Tabla 20). Secciones de hígado de las 7 quimeras hematopoyéticas teñidas con NBT mostraba que todos los animales presentaban parches vasculares y señal dispersa alrededor de los vasos sanguíneos (Figura 35) con una densidad de parches de 0.35 ± 0.22 nº de parches/cm² y $6.9 \pm 5.6 \times 10^{-5}$ área total de parches/cm² (Tabla 21).

La tinción con anticuerpos específicos y análisis con el microscopio confocal muestra que las células PLAP+ dentro del parche expresan Isolectina B4 y la mayoría son negativas para CD45, indicando su naturaleza endotelial (Figura 35).

Ninguno de los 39 animales trasplantados con la población PLAP- presentaba quimerismo hematopoyético en sangre periférica. 11 animales fueron seleccionados para el análisis de la presencia de células PLAP+ en secciones de hígado mediante tinción con NBT. No se observó ninguna célula PLAP+ en un total de superficie analizada de 131.2cm². (Tabla 21)

Para asegurar la optimización de la transferencia de células al receptor, un grupo de 3 experimentos se realizaron co-trasplante células PLAP+ y PLAP- con 2×10^6 células de médula ósea de adulto transgénico para el marcador LacZ (MO_{laz}). Esto nos permite seleccionar animales trasplantados con células PLAP- (carentes de actividad CMHs) por el injerto hematopoyético LacZ en sangre, derivado del donante de médula. El co- trasplante

con médula ósea no interfiere con la capacidad de repoblación de las células PLAP+, manteniéndose una frecuencia de quimerismo hematopoyético (2 animales FACS-PLAP+ en sangre periférica de 5 trasplantados) y frecuencia de formación de parches vasculares similar al obtenido en trasplantes de células PLAP+ (0.35 ± 0.22 parches vasculares/cm² en quimeras trasplantadas con PLAP+ versus 0.19 ; 0.16 parches vasculares/cm² en 2 animales co- trasplantados con PLAP+ y MO_{LacZ}). En ninguno de los 5 animales analizados co- trasplantados con células PLAP- y MO_{LacZ} se observan parches vasculares, confirmando los datos anteriores que indican la ausencia de actividad de repoblación vascular y hematopoyética en la población PLAP- (Tabla 21).

Es relevante mencionar que tanto la actividad hematopoyética como vascular en la población fraccionada PLAP+ esta disminuida con respecto a la población total no fraccionada de hígado fetal (PLAP+: 50% quimeras hematopoyéticas y 0.3 ± 0.2 parches vasculares/cm² versus Hígado Fetal total 100% quimeras hematopoyéticas y 3.9 ± 2 parches vasculares/cm²), no pudiéndose excluir que el proceso de purificación de poblaciones por citometría de flujo interfiera en la funcionalidad celular en trasplantes.

En resumen, en las condiciones experimentales empleadas, estos datos indican que toda la actividad de repoblación vascular y hematopoyética se localiza en la población de células de hígado fetal SCL3'Enh- PLAP+ mientras que la población PLAP- no presenta ninguna de estas actividades.

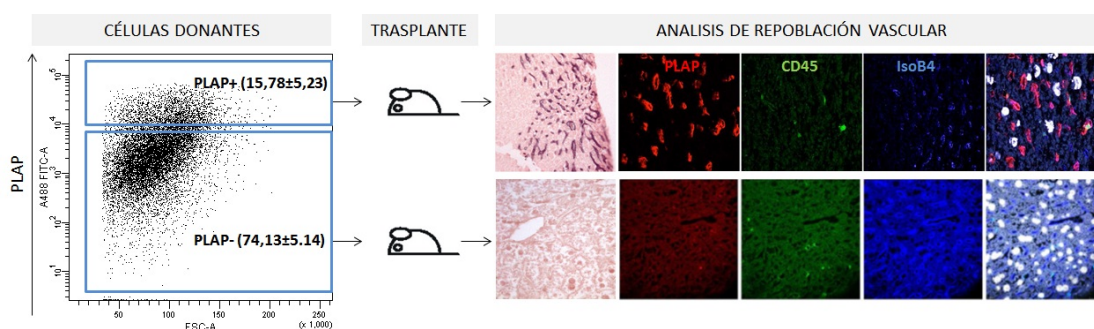


FIGURA 35. Injerto hemato-vascular de células SCL3'Enh PLAP+/PLAP- aisladas por FACS.

Gráfico mostrando células de hígado fetal de día 12 teñido para PLAP. Se representan las ventanas de selección para las poblaciones PLAP+ y PLAP- trasplantadas a receptores recién nacidos. Los animales se sacrifican a los 5 meses post-trasplante y se determina la repoblación hemato-vascular (tabla 20 y 21). Las imágenes mostradas corresponden a secciones de hígado de quimeras trasplantadas con la población PLAP+ (panel superior) y PLAP- (panel inferior). La tinción con NBT muestra las células PLAP+ distribuidas formando parches. La tinción con anticuerpos anti-PLAP (rojo), anti-CD45 (verde), IsoB4 (azul) y DAPI (gris) revela la aparición de parches endoteliales PLAP+IsoB4+CD45- en quimeras SCL3'Enh-PLAP+. Fotos tomadas a aumento de 200x y 400x en el microscopio Leica DM5000B (tinción NBT) y confocal Leica DM2500/TCS SPE (tinción con anticuerpos).

TABLA 20. Frecuencia de repoblación hematopoyética de quimeras trasplantadas con las poblaciones SCL3'Enh PLAP+/PLAP-

Población trasplantada	Nº de células trasplantadas/ receptor ($\times 10^4$)	ee/ receptor	Nº ratones PLAP+ en sangre/ Nº ratones trasplantados	% FACS-PLAP+ en sangre (rango)
PLAP+	2-6	2.4- 4	7/14	12,7 \pm 9,3 (1-29,5)
PLAP+ +MO _{lacZ}	2 + 2 $\times 10^6$	2.4	2/5	1 - 20
PLAP-	6 - 500	0.8- 2.6	0/39	0
PLAP- +MO _{lacZ}	6 + 2 $\times 10^6$	0.8	0/10*	0

Células PLAP+ y PLAP - de hígado fetal E12 fueron seleccionadas por citometría de flujo y trasplantadas en presencia o no de células de médula ósea de adulto con el marcador genético lacZ (MO_{lacZ}). A los 5 meses se determina el porcentaje de células PLAP+ en circulación por análisis FACS y se calcula la media de aquellos que son positivos. *5 animales de 10 trasplantados con médula ósea LacZ (MO_{lacZ}) presentaban señal LacZ en sangre y se analizan para contribución vascular.

TABLA 21. Frecuencia de repoblación vascular en hígado de quimeras trasplantadas con las poblaciones SCL3'Enh PLAP+/PLAP-

Célula donante	Quimera	Área total analizada (cm ²)	Nº de parches PLAP+	Área de parches PLAP+ (cm ²)	Nº parches PLAP+/cm ²	Área de parches PLAP+/cm ² ($\times 10^{-5}$)
PLAP+	1 (4290)	5.52	2	0.0008	0.36	15.3
	2 (4442)	24.25	4	0.0006	0.16	2.6
	3 (4476)	14.71	6	0.0006	0.41	4.3
	4 (4473)	9.8	2	0.0007	0.20	7.5
	5 (4557)	14.71	3	0.0003	0.20	1.8
	6 (4556)	6.13	2	0.0002	0.33	2.8
	7 (4561)	9.8	8	0.0013	0.82	14
	(n=7)	12.1 \pm 6.5	3.9 \pm 2.3	0.0007 \pm 0.0003	0.35 \pm 0.22	6.9 \pm 5.6
PLAP+MO _{lacZ}	1 (5729)	14	4	0.0004	0.19	1.7
	2 (5732)	12.3	2	0.0006	0.16	4.9
	MEDIA (n=9)	12.4\pm5.6	3.6\pm2.1	0.0006\pm0.0003	0.31\pm0.22	6.1\pm5.2
		Suma=111.3				
PLAP-	(n=11)	11.9 \pm 5.2	0	-	-	-
		Suma= 131.2				
PLAP-MO _{lacZ}	(n=5)	14.4 \pm 6.5	0	-	-	-
		Suma= 72.3				
	MEDIA (n=16)	12.7\pm5.6	0	-	-	-
		Suma=203.5				

Secciones de hígado teñidas con NBT son cuantificadas por acotamiento zonal de área descrito en materiales y métodos. Se calcula el área total de tejido analizado, el número de parches y la suma del área de parches. Con estos valores calculamos el número y extensión de área relativa de los parches vasculares para cada quimera. La media y desviación estándar de los datos obtenidos son los resultados de contribución vascular.

2.2.2 Las células SCL3'EnhPLAP+VE-Cad+ contienen actividad vascular y hematopoyética trasplantable

Con la finalidad de determinar si la actividad de repoblación vascular de la población SCLPLAP+ estaba asociada con la expresión de VE-Cadherina, purificamos y trasplantamos en recién nacidos las poblaciones PLAP+VE-Cad+ y PLAP+VE-Cad-. Como se muestra en la figura 36, un 2% de la población total de hígado fetal es PLAP+VE-Cad+ (media de 5 experimentos $1,3\% \pm 0,43$) y un 6% es PLAP+VE-Cad- (media $7,15\% \pm 2,75$). El número de células PLAP+VE-Cad+ trasplantadas por individuo fue de $1-3 \times 10^4$ y de PLAP+VE-Cad- $5-15 \times 10^4$, valores que corresponden a un número de embriones equivalentes de 3.5- 8.5 y 2.8- 5, respectivamente (Tabla 22).

8 animales de los 12 trasplantados con las células PLAP+VE-Cad+ (de los cuales, 2 de 4 co-trasplantados con MO_{LacZ}) presentan quimerismo hematopoyético a largo plazo en sangre y en órganos hematopoyéticos como muestran los datos obtenidos por PCR-PLAP. La frecuencia de células donantes FACS-PLAP+ en circulación varía entre 1.4-14.8% (Tabla 22). Secciones de hígado de las quimeras hematopoyéticas teñidas con NBT muestran que de las 8 quimeras hematopoyéticas, 6 presentan señal positiva en forma de parche vascular, señal dispersa y peri-vascular (Figura 36). La cuantificación de la contribución vascular rinde unos valores medios para los 6 animales analizados de $1,53 \pm 1,81$ parches/cm² y $42,6 \pm 44,1 \times 10^{-5}$ área total de parches/cm² (Tabla 23).

La frecuencia de injerto hematopoyético y vascular disminuía drásticamente en animales trasplantados con la población PLAP+VE-Cad-. Así, de 13 animales trasplantados con células PLAP+VE-Cad- y 9 animales co-trasplantados con células PLAP+VE-Cad- y células de médula ósea de adulto LacZ (MO_{LacZ}) se obtuvieron 4 quimeras hematopoyéticas (Tabla 22). De estos 4 animales ninguno presentaba parches vasculares en el hígado (Tabla 23). Todas las quimeras hematopoyéticas, tanto las trasplantadas con la población SCL3'EnhPLAP+VE-Cad+, como las trasplantadas con células VE-Cad-, presentan células PLAP+ alrededor de los vasos sanguíneos.

En resumen, estos datos indican que la población PLAP+VE-Cad+ contiene la gran mayoría de la actividad de repoblación vascular en forma de parche mientras que esta actividad no se detecta en la población PLAP+VE-Cad-. Por otra parte la actividad de repoblación hematopoyética y hemato-vascular alrededor de los espacios portales está presente en las dos poblaciones.

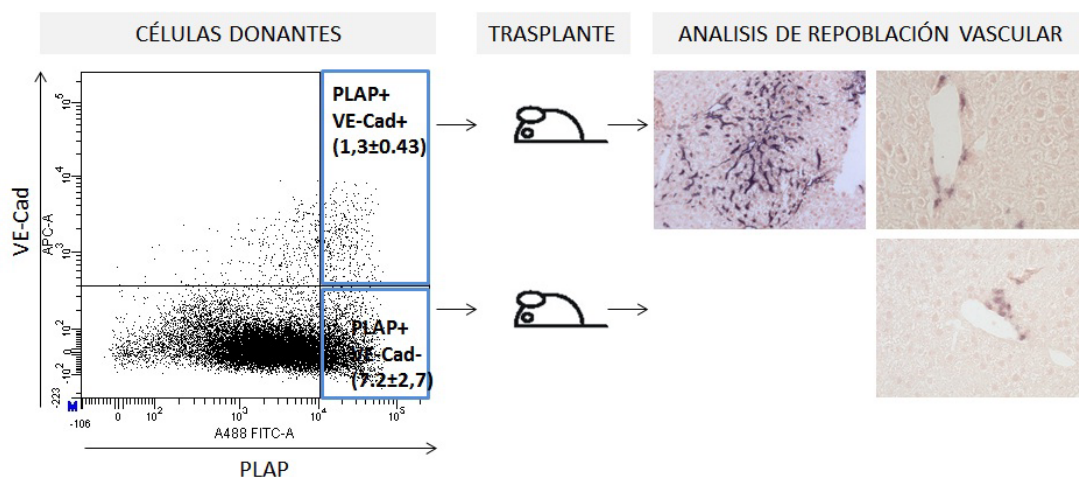


FIGURA 36. Injerto hemato-vascular de células SCL3'EnhPLAP+ VE-Cad+ y VE-Cad- aisladas por FACS.

Gráfico mostrando células de hígado fetal de día 12 teñido para PLAP Y VE-Cad. Se representan las ventanas de selección para las poblaciones PLAP+VE-Cad+ y PLAP+VE-Cad- trasplantadas a receptores recién nacidos. Los animales se sacrifican a los 5 meses post trasplante y se determina la repoblación hemato- vascular (tabla 22 y 23). Las imágenes mostradas corresponde a secciones de hígado teñidas con NBT de las quimeras trasplantadas con la población PLAP+VE-Cad+ (panel superior) y PLAP+VE-Cad- (panel inferior). La población VE-Cad+ genera parches y señal alrededor de los vasos, mientras que la población VE-Cad-, señal dispersa. Fotos tomadas a aumento de 200x y 400x en el microscopio Leica DM5000B.

TABLA 22. Frecuencia de repoblación hematopoyética de quimeras trasplantadas con las poblaciones SCL3'EnhPLAP+VE-Cad+/VE-Cad-

Población trasplantada	Nº de células trasplantadas/ receptor (x10 ⁴)	ee/ receptor	Nº ratones PLAP+ en sangre/ Nº ratones trasplantados	% FACS-PLAP+ en sangre (rango)
PLAP+VE-Cad+	1-3	3.5-8.5	6/8	8.1±4.4 (1.4-14.8)
PLAP+VE-Cad+ +MO _{lacZ}	1.3 + 2 x 10 ⁶	3.5	2/4	11.3-14.8
PLAP+VE-Cad-	5-15	2.8-5	2/13	2.3-10.8
PLAP-VE-Cad- +MO _{lacZ}	5-15 + 2 x 10 ⁶	2.8-5	2/9	1-2.4

Células PLAP+VE-Cad+ y PLAP+VE-Cad - de hígado fetal E12 fueron seleccionadas por citometría de flujo y trasplantadas en presencia o no de células de médula ósea de adulto con el marcador genético lacZ (MO_{lacZ}). A los 5 meses se determina el porcentaje de células PLAP+ en circulación por análisis FACS y se calcula la media de aquellos que son positivos.

TABLA 23. Frecuencia de repoblación vascular en hígado de quimeras trasplantadas con las poblaciones SCL3'EnhPLAP+VE-Cad+/VE-Cad-

Célula donante	Quimera	Área total analizada (cm ²)	Nº de parches PLAP+	Área de parches PLAP+(cm ²)	Nº parches PLAP+/cm ²	Área de parches PLAP+/cm ² (x 10 ⁻⁵)
PLAP+VECad+	1 (6132)	9.8	4	0.0004	0.41	4.2
	2 (6151)	9.8	4	0.0052	0.41	53.2
	3 (6152)	9.8	4	0.0009	0.41	9.4
	4 (7050)	9.8	37	0.0102	3.77	104.6
	5 (7051)	9.8	39	0.0080	3.98	82.1
	6 (5800)	9.8	2	0.0002	0.21	2.5
	MEDIA (n=6)	9.8 Suma=58.8	15±17.8	0.0042±0.0043	1.53±1.81	42.6±44.1
PLAP+VECad-	MEDIA	18.5±9.4	0	-	-	-
	(n=4)	Suma=74,2				

Secciones de hígado teñidas con NBT son cuantificadas por acotamiento zonal de área descrito en materiales y métodos. Se calcula el área total de tejido analizado, el número de parches y la suma del área de parches. Con estos valores calculamos el número y extensión de área relativa de los parches vasculares para cada quimera. La media y desviación estándar de los datos obtenidos son los resultados de contribución vascular.

2.2.3 Las células SCL3'EnhPLAP+CD45+ no generan parches vasculares.

Con la finalidad de determinar si la actividad de repoblación vascular de la población SCLPLAP+ estaba incluida en la población hematopoyética CD45+, purificamos y trasplantamos en recién nacidos células PLAP+CD45+ y PLAP+CD45-. Como se muestra en la figura 37, un 3% de la población total de hígado fetal es PLAP+CD45+ (media de 8 experimentos 3.28 ± 0.65) y un 6% es PLAP+CD45- (media 6.28 ± 2.16). El número de células PLAP+CD45+ trasplantadas por individuo fue de $2.5-8 \times 10^4$ y de PLAP+CD45- $2.5-5 \times 10^4$, valores que corresponden a un número de embriones equivalentes de 3-5.6 y 3-3.4, respectivamente como muestra la tabla 24.

19 animales de los 27 animales trasplantados con las células PLAP+CD45+ presentan quimerismo hematopoyético a largo plazo en sangre y en órganos hematopoyéticos (1.7-15.3% de células donantes FACS-PLAP+ en circulación) (Tabla 24). Secciones de hígado de las 19 quimeras hematopoyéticas teñidas con NBT mostraban que ninguna presentaba parche vascular PLAP+ (un área total de hígado analizado de 274.4 cm^2) (Tabla 25). Sin embargo, todas las quimeras mostraban células PLAP+ alrededor de los vasos sanguíneos (figura 37).

2.2.3.1 La incubación con anticuerpo anti-CD45 no afecta la formación de parches vasculares.

La molécula CD45 es una glicoproteína de superficie celular conocida también como antígeno común leucocitario (*common leucocyte antigen*, CLA), que funciona como una tirosina fosfatasa y parece ser crucial para los procesos de activación celulares (Trowbridge and Thomas 1994). También se han descrito anticuerpos con actividad inhibitoria en la diferenciación eritroide de células del cordón umbilical (Harashima, Suzuki et al. 2002). Aunque CD45 no se expresa en células endoteliales maduras, bajos niveles de esta molécula se detectan en precursores endoteliales (Bertolini, Shaked et al. 2006; Qin, Li et al. 2006). Por tanto nos planteamos la posibilidad de que el anticuerpo anti-CD45 empleado pudiera interferir con la generación de parches vasculares a partir de progenitores PLAP+CD45+. Para testar esta posibilidad, incubamos las células de hígado fetal de día 12 con el anticuerpo anti-CD45 previo a su trasplante. Dos animales trasplantados con células sin tratar y 3 con células tratadas fueron analizados 5 meses post trasplante. Todos los animales presentaban quimerismo hematopoyético y parches vasculares en el hígado. Por tanto, el anticuerpo anti-CD45 no afecta a la formación de parches vasculares.

Considerando los datos anteriores podemos concluir que la población SCL3'Enh-PLAP+CD45+ no presenta potencial vascular en forma de parche pero si contribuye a los espacios peri-vasculares, con una gran mayoría de células PLAP+ hematopoyéticas y una minoría PLAP+ endoteliales.

2.2.3.2 Las células PLAP+CD45- originan parches vasculares y no contribuyen a los espacios portales.

Considerando que la población CD45- de hígado fetal no presenta células madre hematopoyética y por tanto carece de capacidad de repoblación hematopoyética a largo plazo, todos los animales trasplantados con la población PLAP+CD45- se co- trasplantaron con células de médula ósea LacZ (MO-A_{LacZ}) para asegurar la eficiencia de trasplante. De los 17 animales co- trasplantados con estas células no se obtuvo ninguna quimera hematopoyética PLAP+ por análisis en sangre periférica por PCR-PLAP, sin embargo 13 presentaban señal LacZ (Tabla 24). De estos 13 animales 3 tenían parches vasculares con una frecuencia de 0.38 ± 0.08 parches/cm² y área de $15.7 \pm 5.4 \times 10^{-5}$ cm² de parches/cm² área

total (Tabla 25). Ningún individuo presentaba células PLAP+ alrededor de los espacios portales (Figura 37).

Por tanto, el potencial de diferenciación vascular en forma de parche en secciones de hígado solo se detecta en la población no hematopoyética SCL3'Enh-PLAP+CD45-. Es interesante resaltar que en ninguna de estas 3 quimeras se observó señal dispersa NBT+ alrededor de los vasos sanguíneos, sugiriendo que esta actividad esta asociada a la actividad de repoblación hematopoyética y no a la actividad de repoblación vascular en forma de parche.

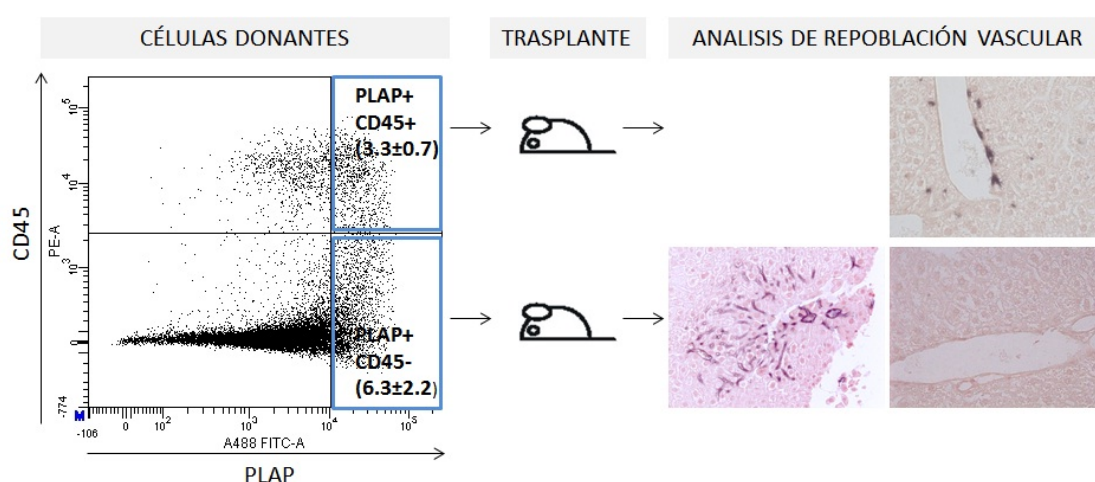


FIGURA 37. Injerto hemato-vascular de células SCL3'EnhPLAP+ CD45+ Y CD45- aisladas por FACS.

Gráfico mostrando células de hígado fetal de día 12 teñido para PLAP Y CD45. Se representan las ventanas de selección para las poblaciones PLAP+CD45+ y PLAP+CD45- trasplantadas a receptores recién nacidos. Los animales se sacrifican a los 5 meses post trasplante y se determina la repoblación hemato- vascular (tabla 24 y 25). Las imágenes mostradas corresponde a secciones de hígado teñidas con NBT de las quimeras trasplantadas con la población PLAP+CD45+ (panel superior) y PLAP+CD45- (panel inferior). La población CD45+ se distribuye alrededor de los vasos, mientras que la población CD45- genera parches vasculares y no se integra alrededor de los vasos sanguíneos. Fotos tomadas a aumento de 200x y 400x en el microscopio Leica DM5000B.

TABLA 24. Frecuencia de repoblación hematopoyética de quimeras trasplantadas con las poblaciones SCL3'EnhPLAP+CD45+/CD45-

Población trasplantada	Nº de células trasplantadas/ receptor ($\times 10^4$)	ee/ receptor	Nº ratones PLAP+ en sangre/ Nº ratones trasplantados	% FACS-PLAP+ en sangre (rango)
PLAP+CD45+	2.5-8	3-5.6	19/27	8.18±3.9
+MO _{lacZ}	+ 2×10^6			(1.7-15.3)
PLAP+CD45-	2.5-5	3-3.4	0/17*	0
+MO _{lacZ}	+ 2×10^6			

Células PLAP+CD45+ y PLAP+CD45- de hígado fetal E12 fueron seleccionadas por citometría de flujo y trasplantadas en presencia de células de médula ósea de adulto con el marcador genético lacZ (MO_{lacZ}). A los 5 meses se determina el porcentaje de células PLAP+ en circulación por análisis FACS y se calcula la media de aquellos que son positivos. *13 de 17 animales co-trasplantados con células PLAP- + MO_{lacZ} presentan quimerismos lacZ+ y son los que se analizan para repoblación vascular.

TABLA 25. Frecuencia de repoblación vascular en hígado de quimeras trasplantadas con las poblaciones SCL3'EnhPLAP+CD45+/CD45-

Célula donante	Quimera	Área total analizada (cm ²)	Nº de parches PLAP+	Área de parches PLAP+(cm ²)	Nº parches PLAP+/cm ²	Área de parches PLAP+/cm ² (x 10 ⁻⁵)
PLAP+CD45+	MEDIA (N= 19)	14.4±7 Suma=274.4	0	-	-	-
PLAP+CD45-	1 (5298)	13.8	4	0.003	0.29	19.1
	2 (6740)	11.03	5	0.001	0.45	9.5
	3 (6977)	10.4	4	0.002	0.38	18.6
	MEDIA (N=3)	11.7±1.8 Suma= 35.3	4.3±0.6	0.002±0.0008	0.38±0.08	15.7±5.4
	MEDIA (N=10)	13.4±7.2 Suma= 134	0	-	-	-

Secciones de hígado teñidas con NBT son cuantificadas por acotamiento zonal de área descrito en materiales y métodos. Se calcula el área total de tejido analizado, el número de parches y la suma del área de parches. Con estos valores calculamos el número y extensión de área relativa de los parches vasculares para cada quimera. La media y desviación estándar de los datos obtenidos son los resultados de contribución vascular.

2.2.4 Las células de hígado fetal de día 12 SCL3'Enh-PLAP+VE-Cad+CD45- tienen actividad vascular en forma de parche, mientras que las PLAP+VE-Cad+CD45+ contribuyen a los espacios portales peri-vasculares.

Para determinar si la actividad de repoblación vascular de la población SCLPLAP+CD45- estaba asociada con la expresión de VE-Cadherina y confirmar la presencia solamente de CMHs en la población VE-CadCD45+ (Taoudi, Morrison et al. 2005), purificamos y trasplantamos en recién nacidos las poblaciones PLAP+VE-Cad+CD45- y PLAP+VE-Cad+CD45+. Como se muestra en la figura 38 un 5% de la población PLAP+ de hígado fetal es VE-Cad+CD45+ (media de 3 experimentos 4.45±3.6) y un 8% es VE-Cad+CD45- (media 7.1±0.28). El mismo número de células PLAP+VE-Cad+CD45+ y de células PLAP+VE-Cad+CD45- fueron trasplantadas por individuo (1-2 x 10⁴ células/receptor) junto con células de médula ósea LacZ (MO-A_{LacZ}) para asegurar la eficiencia de trasplante. Este número de células corresponden a un número de embriones equivalentes de entre 4 y 6 por receptor, como muestra la tabla 26.

6 animales de los 9 trasplantados con las células PLAP+VE-Cad+CD45+ presentan quimerismo hematopoyético a largo plazo en sangre como muestran los datos obtenidos por PCR-PLAP y PCR-LacZ. La frecuencia de células donantes FACS-PLAP+ en circulación variaba entre 8.1- 17.7% (Tabla 26). Secciones de hígado de las quimeras hematopoyéticas

teñidas con NBT muestran que de las 6 quimeras hematopoyéticas analizadas, ninguna presenta señal positiva en forma de parche vascular, solamente señal dispersa alrededor de los vasos sanguíneos (Figura 38) en un porcentaje superior a lo obtenido en trasplantes con hígado fetal total ($43.3 \pm 9.4\%$ versus 10.6 ± 8.6 de vasos con células PLAP+ en quimeras trasplantadas con la población PLAP+VE-Cad+CD45+ e hígado fetal total, respectivamente) (Tabla 27 y Tabla 13). Como era de esperar, ninguno de los 9 animales trasplantados con células PLAP+VE-Cad+CD45- presentaban señal PLAP+ en sangre periférica. De estos, 8 animales presentaban señal PCR-lacZ en sangre y fueron analizados en secciones de hígado encontrándose parches vasculares en uno de ellos (0.52 parches/cm² y 12.6×10^{-5} área total de parches/cm²) (Tabla 26 y 27).

Estos datos indican que la población PLAP+VE-Cad+CD45- es capaz de generar los parches vasculares en el hígado pero no contiene actividad de repoblación hematopoyética. Esta actividad se localiza en las poblaciones PLAP+VE-Cad+CD45+ y PLAP+VE-Cad-CD45+. La repoblación hemato-vascular asociada a espacios portales de mediano calibre esta asociada a la actividad hematopoyética.

Para confirmar la naturaleza vascular, realizamos análisis con el microscopio confocal de las células PLAP+ dentro de los parches en la quimera trasplantadas con la población seleccionada para los marcadores PLAP+VE-Cad+CD45- y observamos co-expresión de PLAP con Isolectina B4, indicando la naturaleza endotelial (Figura 39B). Sin embargo, las células que rodean los vasos sanguíneos en las quimeras trasplantadas con la población PLAP+VE-Cad+CD45+ están compuestas principalmente por células sanguíneas CD45+ y algunas endoteliales CD45-IsoB4+, la gran mayoría son negativas para el marcador de macrófagos F4/80 (Figura 39A)

Concluimos por tanto que la actividad de repoblación vascular en forma de parches microvasculares en trasplantes con hígado fetal proviene principalmente de una población angioblástica que expresa el enhancer de SCL y VE-Cadherina y no expresa CD45 (Figura 40). De aquí en adelante la denominaremos Células Progenitoras Endoteliales Trasplantables "*Transplantable Endothelial Progenitor Cells*" (TEPCs). Esta población no contiene células madre hematopoyéticas con capacidad de repoblar.

Por otro lado, las células madre hematopoyéticas no presentan capacidad de formar parches vasculares en el hígado, sin embargo pueden contribuir extensamente al componente hemato-vascular que rodea los vasos de mediano y gran calibre (Figura 40). Más estudios se necesitan para determinar si existen no solo diferencias cuantitativas sino también

cualitativas en la contribución peri-vascular de los vasos entre células madre hematopoyéticas donantes de hígado fetal y células derivadas de médula ósea.

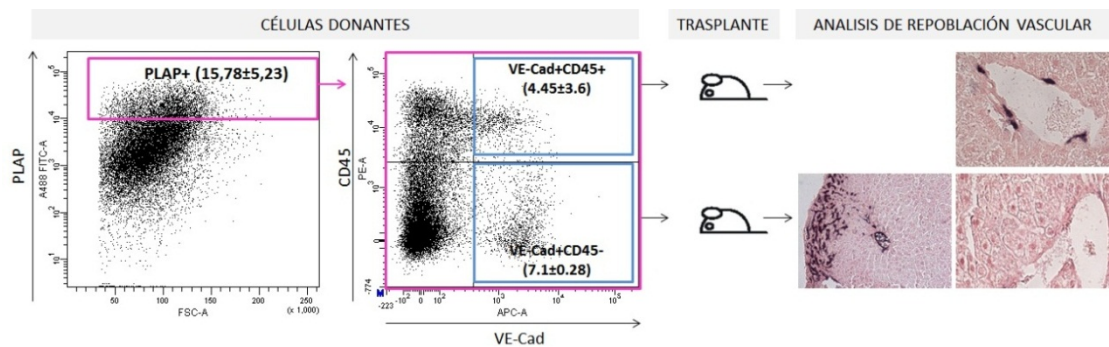


FIGURA 38. Injerto hemato-vascular de células SCL3’EnhPLAP+ VE-Cad+ CD45+ y CD45- aisladas por FACS. El primer gráfico muestra la ventana de selección de células de hígado fetal de día 12 teñido para PLAP, dentro de ésta población, creamos un nuevo gráfico donde seleccionamos las poblaciones VE-Cad+CD45+ y VE-Cad+CD45-. Estas células son trasplantadas a receptores recién nacidos. Los animales se sacrifican a los 5 meses post trasplante y se determina la repoblación hemato- vascular (tabla 26 y 27). Las imágenes mostradas corresponde a secciones de hígado teñidas con NBT de las quimeras trasplantadas con la población PLAP+VE-Cad+CD45+ (panel superior) y PLAP+VE-Cad+CD45- (panel inferior). La población PLAP+VE-Cad+CD45+ se distribuye alrededor de los vasos y no forma parches vasculares, mientras que la población PLAP+VE-Cad+CD45- genera parches vasculares pero no se integra en los vasos sanguíneos. Fotos tomadas a aumento de 200x y 400x en el microscopio Leica DM5000B.

TABLA 26. Frecuencia de repoblación hematopoyética de quimeras trasplantadas con las poblaciones SCL3’EnhPLAP+VECad+CD45+/CD45-

Población trasplantada	Nº de células trasplantadas/ receptor (x10 ⁶)	ee/ receptor	Nº ratones PLAP+ en sangre/ Nº ratones trasplantados	% FACS-PLAP+ en sangre (rango)
PLAP+VE-Cad+CD45+	1-2	4-6	6/9	13.3±3.8
+MO _{lacZ}	+ 2 x 10 ⁶			(8.1-17.7)
PLAP+VE-Cad+CD45-	1-2	3.4-6	0/9*	0
+MO _{lacZ}	+ 2 x 10 ⁶			

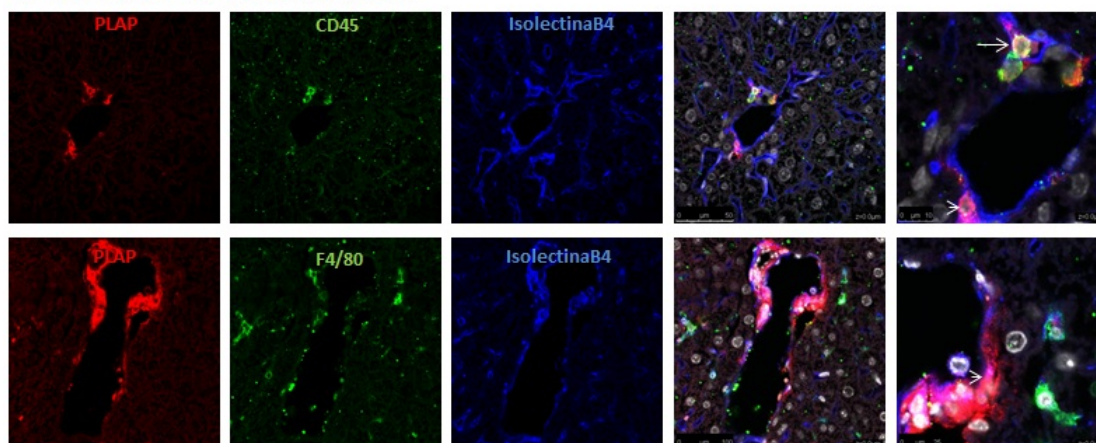
Células PLAP+VE-Cad+CD45+ y PLAP+VE-Cad+CD45- de hígado fetal E12 fueron seleccionadas por citometría de flujo y trasplantadas en presencia de células de médula ósea de adulto con el marcador genético lacZ (MO_{lacZ}). A los 5 meses se determina el porcentaje de células PLAP+ en circulación por análisis FACS y se calcula la media de aquellos que son positivos. *8 de 9 animales co-trasplantados con células PLAP+VE-Cad+CD45- + MO_{lacZ} presentan quimerismos lacZ+ y son los que se analizan para repoblación vascular.

TABLA 27. Frecuencia de repoblación vascular de quimeras trasplantadas con las poblaciones SCL3'EnhPLAP+VECad+CD45+/CD45-

Célula donante	Quimera	% de vasos PLAP+	Área total analizada (cm ²)	Nº de parches PLAP+	Área de parches PLAP+(cm ²)	Nº parches PLAP+/cm ²	Área de parches PLAP+/cm ² (x 10 ⁻⁵)
PLAP+VE-Cad+CD45+	n=6	43.3± 9.4 (32.5-49.4)	18.21±3.7 Suma=127.5	0	-	-	-
PLAP+VE-Cad+CD45-	1 (8021)	0	17.2	9	0.0022	0.52	12.6
	n=7	0	13.5±5.1 Suma=98.1	0	-	-	-

En secciones de hígado teñidas con NBT se contabiliza el número de vasos sanguíneos con células PLAP+ a su alrededor respecto del total de vasos sanguíneos de mediano calibre por el que está compuesto cada sección, representándolo en porcentaje. Por el método de acotamiento zonal de área descrito en materiales y métodos se calcula el área total de tejido analizado, el número de parches y la suma del área de parches. Con estos valores calculamos el número y extensión de área relativa de los parches vasculares.

A- Quimera PLAP+VE-Cad+CD45+



B- Quimera PLAP+VE-Cad+CD45-

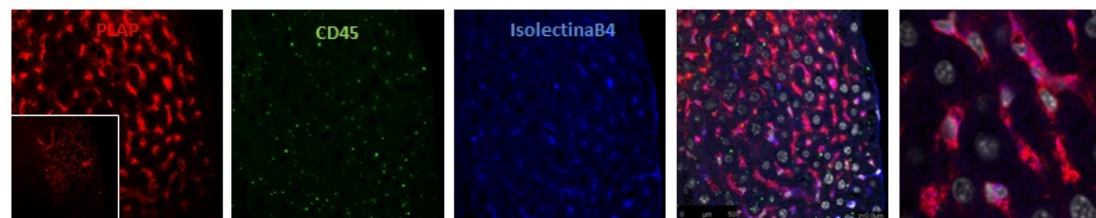


FIGURA 39. Caracterización de las células donantes SCL3'EnhPLAP+VE-Cad+CD45+ y CD45- integradas en hígado.

La tinción con anticuerpos anti-PLAP (rojo), anti-CD45 o F4/80 (verde), IsoB4 (azul) y DAPI (gris) revela que en las quimeras trasplantadas con la población PLAP+VE-Cad+CD45+ las células que se encuentran alrededor de los vasos sanguíneos tienen una naturaleza hematopoyética (PLAP+CD45+) (flecha), ó endotelial (PLAP+IsoB4+) (punta de flecha), y la gran mayoría no co- expresa el marcador de macrófagos F4/80. En la quimera trasplantada con la población PLAP+VE-Cad+CD45-, los parches encontrados co-expresan PLAP e Isolectina B4, indicando la naturaleza endotelial de los mismo. Fotos tomadas a aumento 400x y zoom 3.5 de 400x en el microscopio confocal Leica DM2500/TCS SPE

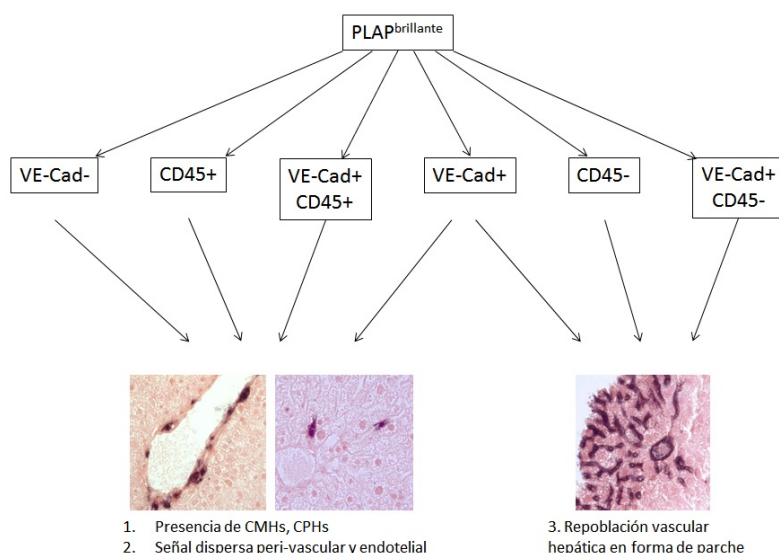


FIGURA 40. Esquema resumen de células de hígado fetal E12 SCL-PLAP^{brillante+} con actividad de repoblación hematopoyética y vascular.

Las poblaciones que contiene el marcador CD45+, ya sea VE-Cad+ o VE-Cad- contienen CMHs o CPHs con potencial de repoblar el sistema sanguíneo y además se integran en hígado alrededor de los vasos sanguíneos y de forma dispersa. La formación de parches microvasculares, está asociado a una población que expresa el SCL-PLAP, VE-Cadherina, pero no CD45.

2.3 Potencial de diferenciación vascular en otros órganos: riñón y corazón.

En el capítulo 1 hemos demostrado que las células de hígado fetal de día 12 pueden contribuir a parches vasculares en órganos diferentes al hígado como el riñón y corazón. Análisis de otros órganos entre los que se incluyen el páncreas, pulmón y medula ósea no muestran contribución a la red micro-vascular. Es interesante resaltar de todas formas la alta contribución en el pulmón de células PLAP+ mayoritariamente CD45+, cuya naturaleza desconocemos (datos no mostrados). En este apartado presentamos el análisis de la contribución vascular en riñón y corazón de las diferentes poblaciones del hígado fetal seleccionadas por citometría de flujo para SCL-PLAP+ y el marcador hematopoyético (CD45) y endotelial (VE-Cad). Cuantificamos el número de animales que presentaban parches en ambos órganos (Tabla 28).

En el riñón, encontramos parches en animales trasplantados con las poblaciones seleccionadas para PLAP+, PLAP+VE-Cad+, PLAP+CD45+ y PLAP+VE-Cad+CD45+, es decir, solo aquellos trasplantados con la población que contiene células hematopoyéticas generan parches en riñón (Figura 41). En el caso del corazón, solo encontramos un animal

trasplantado con PLAP+VE-Cad+ con parche, indicando una menor frecuencia de generación de estos parches en este órgano ya descrito en el capítulo 1.

Estos datos sugieren que la población de células TEPC aisladas de hígado fetal caracterizadas como PLAP+VE-Cad+CD45- solo tienen potencial de diferenciación a parche vascular en hígado. Las células que se integran en riñón tienen una naturaleza diferente, posiblemente relacionada con la hematopoyesis.

TABLA 28. Frecuencia de repoblación vascular en riñón y corazón de quimeras trasplantadas con células seleccionadas por FACS.

Células donantes de hígado fetal E12 seleccionado por FACS	Nº ratones con parche en riñón/ Nº ratones PLAP+ en sangre	Nº ratones con parche en corazón/ Nº ratones PLAP+ en sangre
PLAP+	6/8	0/6
PLAP-	0/3	0/3
PLAP+VE-Cad+	6/6	1/6
PLAP+VE-Cad-	0/4	0/4
PLAP+CD45+	2/4	0/4
PLAP+CD45-	0/3*	0/3*
PLAP+VE-Cad+CD45+	3/4	0/4
PLAP+VE-Cad+CD45-	0/1*	0/1*

*presentan contribución LacZ en sangre y parche vascular en hígado.

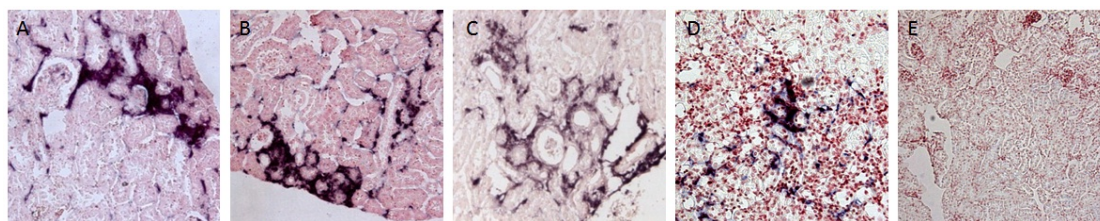


FIGURA 41. Repoblación vascular de células de hígado fetal seleccionadas por FACS en secciones de riñón.

Detección de la actividad PLAP+ mediante tinción NBT en quimeras trasplantadas con diferentes poblaciones: (A) PLAP+, (B) PLAP+VE-Cad+, (C) PLAP+CD45+, (D) PLAP+VE-Cad+CD45+ y (E) PLAP+VE-Cad+CD45-. El injerto vascular en forma de parche en riñón parece estar asociado a la presencia de la población hematopoyética. Imágenes tomadas con microscopio Leica DM5000B a un aumento de 200x

3. ANÁLISIS DE LA DISTRIBUCIÓN ESPACIO-TEMPORAL DE PROGENITORES HEMATO-VASCULARES DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO DE RATÓN.

Durante el desarrollo de ratón diferentes tipos de progenitores vasculares o angioblastos se han descrito, algunos de ellos relacionados con el sistema hematopoyético como el hemangioblasto, precursor común de sangre-endotelio localizado en el saco vitelino (Nishikawa, Nishikawa et al. 1998) y el endotelio hemogénico, un endotelio especial de la aorta dorsal capaz de generar células de sangre in situ (Dieterlen-Lievre and Jaffredo 2009; Eilken, Nishikawa et al. 2009; Lancrin, Sroczynska et al. 2009). La mayoría de los experimentos para determinar el potencial vascular de estas células se han realizado in vitro y menos se conoce sobre el potencial en trasplantes. En este capítulo presentamos un estudio sobre la determinación espacio temporal de precursores hemato-vasculares trasplantables en localizaciones hematopoyéticas durante el desarrollo del ratón. Se analizará el potencial vascular en trasplantes de células del saco vitelino, AGM, placenta e hígado fetal a diferentes estadios de desarrollo.

3.1 Determinación de poblaciones PLAP+VE-Cad+CD45- y PLAP+VE-Cad+CD45+ en diferentes localizaciones hematopoyética en embriones de día 12.

En el capítulo anterior se demuestra que la población PLAP+ de hígado fetal contiene células VE-Cad+CD45+ y VE-Cad-CD45+ con actividad de célula madre hematopoyéticas y células VE-Cad+CD45- con actividad TEPC. Para analizar la distribución de estos marcadores en localizaciones hematopoyéticas en embriones de día 12 de desarrollo (Figura 42), se obtuvo la suspensión celular y se incubó con los anticuerpos indicados. Posteriormente se determinó por FACS el porcentaje de las diferentes poblaciones. En todas las localizaciones se detectaron células PLAP+, confirmando datos previos del grupo empleando tinciones NBT en secciones de embriones (Silberstein, Sanchez et al. 2005). Así mismo, en todas las localizaciones se observa la población PLAP+VE-Cad+CD45- en diferentes proporciones, siendo más prominente en la placenta ($44.3 \pm 7.4\%$ de la población PLAP+) (Figura 43 y Tabla 29). Como se mostro en el capitulo 2, gran parte de las CMHs VE-Cad+CD45+ de hígado fetal E12 expresan PLAP+. Como puede observarse en Figura 43 también se detectan células

PLAP+VE-Cad+CD45+ en el AGM y placenta, potenciales CMHs como previamente otros grupos habían descrito (Taoudi, Morrison et al. 2005). Por tanto, en cuanto al fenotipo, todas estas localizaciones son potencial fuente de actividad TEPC y CMHs (excluyendo el saco vitelino donde no detectamos VE-Cad+CD45+).

En el siguiente apartado se analizara el potencial en trasplante de las células totales no fraccionadas de cada localización.

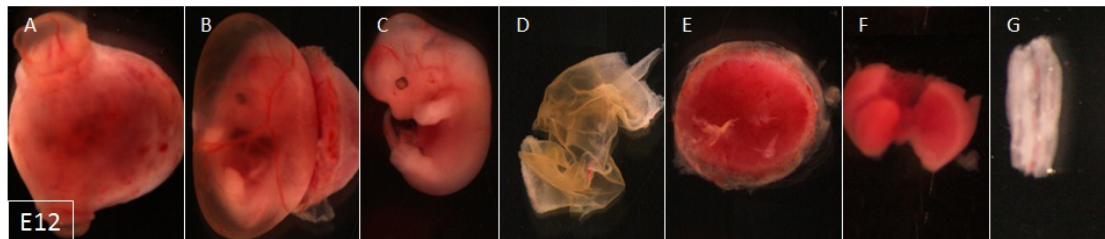


FIGURA 42. Localizaciones hematopoyéticas embrionarias de día 12.

(A) Antes de disecar el útero; (B) Después de disecar el útero, embrión rodeado de saco vitelino y placenta unida; (C) Embrión sin saco vitelino; (D) saco vitelino; (E) Placenta; (F) Hígado fetal; (G) Zona AGM. Las imágenes fueron tomadas a temperatura ambiente usando una lupa Leica MZ16 y una cámara Nikon COOLPIX. A una magnificación de x8 (A-E) y x20 (F-G).

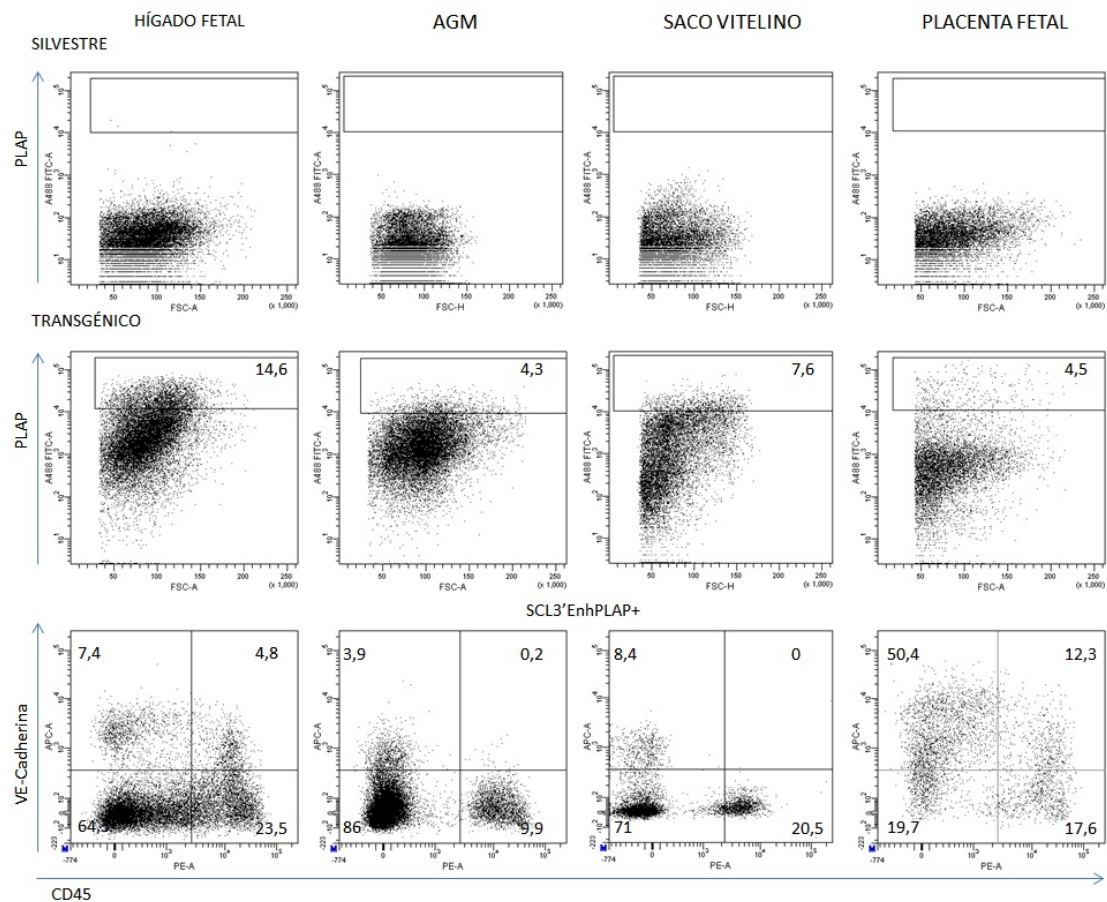


FIGURA 43. Análisis fenotípico comparativo de la expresión de VE-Cad y CD45 en la población PLAP+ en diferentes órganos hematopoyéticos embrionarios de día 12 de desarrollo.

Panel superior, células de embriones silvestres teñidas para el anticuerpo anti-PLAP y el secundario Alexa Fluo 488. Panel intermedio, células de embriones transgénicos teñidas para el anticuerpo anti-PLAP y el secundario Alexa Fluo 488. Panel inferior, gráfico que muestra solo la población seleccionada como SCL3'Enh-PLAP+ teñida para los anticuerpos CD45 conjugado con ficoeritrina y VE-Cadherina conjugado con biotina y el secundario estreptavidina Cy5. Los porcentajes de cada cuadrante están referidos a la población PLAP+

TABLA 29. Frecuencia de poblaciones PLAP+VE-Cad+CD45+ y PLAP+VE-Cad+CD45- en localizaciones hematopoyéticas del embrión a día 12.

Órgano	% FACS-PLAP+	Porcentaje del fenotipo respecto a la población SCL3'EnhPLAP+ (rango)			
		VE-Cad+CD45-	VE-Cad+CD45+	VE-Cad-CD45+	VE-Cad-CD45-
Hígado fetal (n=8)	8.25±3 (5.8-14.6)	8.1±1.5 (6.2-9.5)	3.6±1.4 (2-4.8)	24.9±1.2 (23.5-25.8)	66.5±10.6 (56.9-81.6)
AGM (n=7)	2.9±1 (2-4.3)	3.4±0.7 (2.9-3.9)	0.23±0.15 (0.1-0.4)	7.8±1.9 (6.1-9.9)	83.4±9.8 (72.5-91.5)
Saco vitelino (n=5)	6.3±1.6 (4.6-7.7)	11.6±4.5 (8.4-14.8)	0.03±0.05 (0-0.1)	16.4±3.7 (13.3-20.5)	68.5±3.2 (64.7-71)
Placenta (n=6)	3.9±1 (2.2-4.7)	44.3±7.4 (36.1-50.4)	9.9±2.4 (7.5-12.3)	20.2±3.1 (17.6-23.6)	26.5±7.1 (19.7-33.8)

3.2 Caracterización del potencial de repoblación hemato-vascular en trasplantes de células procedentes de diferentes localizaciones hematopoyética en embriones de día 12.

Para determinar la existencia de potencial vascular trasplantable (TEPC) y contribución peri-vascular portal en otras localizaciones hematopoyéticas a día 12 de desarrollo, trasplantamos células obtenidas de AGM, saco vitelino y placenta de embriones transgénicos SCL-3'Enh-PLAP. Todas estas localizaciones presentan células madre hematopoyéticas capaces de repoblar a largo plazo (Ottersbach and Dzierzak 2005; Taoudi, Morrison et al. 2005).

Un número de células equivalente de 1-2 embriones se trasplantaron por receptor en el caso del AGM y del saco vitelino. En trasplantes con placenta, las células fueron seleccionadas por FACS para SCL3'Enh-PLAP+ (PI -PLAP+) y PLAP- (PI-PLAP-). Esta selección previa se realizó considerando el alto número de células trofoblásticas no hematopoyéticas y no vasculares que disminuyen la frecuencia de progenitores y células madre hematopoyéticas (Ottersbach and Dzierzak 2005). Teniendo en cuenta que la actividad de repoblación CMH en la fracción PI-PLAP- se esperaba que sea negativa, ambas fracciones celulares de placenta se co-

trasplantaron con células de médula ósea adulta MO-A_{LacZ} para asegurar la eficiencia de trasplante.

La frecuencia de quimerismo hematopoyético se determinó a los 5-9 meses post-trasplante. La frecuencia de animales que presentaban quimerismo hematopoyético era similar para los animales trasplantados con hígado fetal y con AGM (5 quimeras de 5 animales trasplantados con hígado fetal y 10 quimeras de 12 trasplantados con AGM), disminuyendo en los animales trasplantados con células del saco vitelino y Pl-PLAP+ (ratio de 5/10 y 7/11 respectivamente). Las células de Pl-PLAP- no tienen capacidad de injerto hematopoyético, (Tabla 30).

La capacidad de repoblación vascular se determinó en las quimeras hematopoyéticas sobre secciones de hígado mediante tinción por NBT y anticuerpos para detección de PLAP, CD45, CD31 e IsoB4, como se indica en apartados anteriores. Células PLAP+ asociadas a espacios portales y señal dispersa no asociada a vasos, se detectaron en todas las quimeras hematopoyéticas (Tabla 31). Esta señal es mayoritariamente de naturaleza hematopoyética (Figura 44A).

Parches vasculares PLAP+ se observaron en todas las quimeras de hígado fetal y en 4 quimeras de 10 de AGM. No se observan parches vasculares en animales trasplantados con células del saco vitelino ni de placenta. La cuantificación de la contribución vascular rinde unos valores medios para los 4 animales trasplantados con AGM de 0.13 ± 0.09 número de parches/cm² mientras que los valores de hígado fetal son mas elevados, de 3.93 ± 2.01 parches/cm² (Tabla 31). Esto indicaría una menor frecuencia de precursores tipo TEPC por AGM comparado con el hígado fetal. La tinción con anticuerpos asociados a células endoteliales y de sangre muestra la naturaleza endotelial de las células SCL-3'Enh-PLAP+ en los parches de hígado en quimeras de AGM (PLAP+CD45-IsoB4+) (Figura 44B), al igual que en las quimeras de hígado fetal.

Estos datos indica que existe una correlación entre la presencia de células PLAP+VE-Cad+CD45+, la actividad de repoblación hematopoyética y el potencial de contribución a las zonas peri-vasculares y vasculares portales en todas las regiones hematopoyéticas en embriones de día 12 de desarrollo. Sin embargo, precursores capaces de generar parches vasculares en hígado solo se encuentran en el hígado fetal y en la zona del AGM.

TABLA 30. Frecuencia de repoblación hematopoyética en quimeras trasplantadas con células de hígado fetal, AGM, saco vitelino (S.V.) y placenta E12.

Células donantes (E12)	Nº de células trasplantadas/ receptor (x10 ⁶)	ee/ receptor	Nº ratones PLAP+ en sangre/ Nº ratones trasplantados	% FACS-PLAP+ en sangre (rango)
Hígado	1.3	1	5/5	5.04±2.25 (1.6-8.2)
AGM	0.55	2	10/12	7.4±5.6 (1-16.5)
S. V.	1	1	5/10	20.9±11.2 (3.4-33)
PI-PLAP+ MO _{LacZ}	0.03-0.06	2-6	7/11*	2.2±1.9 (1-8.5)
PI-PLAP- MO _{LacZ}	0.23	2-3	0/8*	0

Células de diferentes localizaciones hematopoyéticas de E12 fueron trasplantadas solas o en presencia de células de médula ósea de adulto con el marcador genético lacZ (MO_{LacZ}) A los 5 meses se determina el porcentaje de células PLAP+ en circulación por análisis FACS y se calcula la media de aquellos que son positivos. * 9 de 11 animales trasplantados con células de placenta PLAP+ y 5 de 8 trasplantados con células de placenta PLAP- y MO_{LacZ} presentaban señal LacZ en sangre y se analizan para contribución vascular.

TABLA 31. Frecuencia de repoblación vascular en hígado de quimeras trasplantadas con células de hígado fetal, AGM, saco vitelino (S.V.) y placenta.

Célula donante E12	Quimera	% Vasos con células PLAP+	Área total analizada (cm ²)	Nº de parches PLAP+	Área de parches PLAP+(cm ²)	Nº parches PLAP+/cm ²	Área de parches PLAP+/cm ² (x 10 ⁻⁵)
Hígado	MEDIA (n=5)	5±2.6	6.37±1.66 (suma=31.8)	27±18.6	0.0087±0.0053	3.93±2.01	134.13±76.80
AGM	1 (5815)	13	16.1	1	0.00002	0.062	0.123
	2 (5816)	22	38.3	2	0.00031	0.052	0.805
	3 (5820)	11	14.5	2	0.00008	0.138	0.575
	4 (6774)	7	19.6	5	0.0015	0.254	7.669
	MEDIA (n=4)	13.3±6.3	22.12±10.01 (suma=88.5)	2.5±1.7	0.0005±0.007	0.13±0.09	2.29±3.59
	MEDIA (n=6) (8-20)	14±5.1	16.9±10 (suma=118.7)	0	-	-	-
S.V.	MEDIA (n=5)	7.9±13.05 (0.8-23)	15.5±7.2 (suma=77.6)	0	-	-	-
PI-PLAP+	MEDIA (n=9)	5.06±5.3 (0.7-11)	10.3±0.6 (suma=102.9)	0	-	-	-
PI-PLAP-	MEDIA (n=5)	0	10.5±0.7 (suma=52.7)	0	-	-	-

En secciones de hígado teñidas con NBT se contabiliza el número de vasos sanguíneos con células PLAP+ a su alrededor respecto del total de vasos sanguíneos de mediano calibre por el que está compuesto cada sección, representándolo en porcentaje. Por el método de acotamiento zonal de área descrito en materiales y métodos se calcula el área total de tejido analizado, el número de parches y la suma del área de parches. Con estos valores calculamos el número y extensión de área relativa de los parches vasculares para cada quimera. La media y desviación estándar de los datos obtenidos son los resultados de contribución vascular. Se muestran también los valores medios para quimeras trasplantadas con hígado fetal de día 12, desarrollado en la Tabla 14 (Capítulo 1)

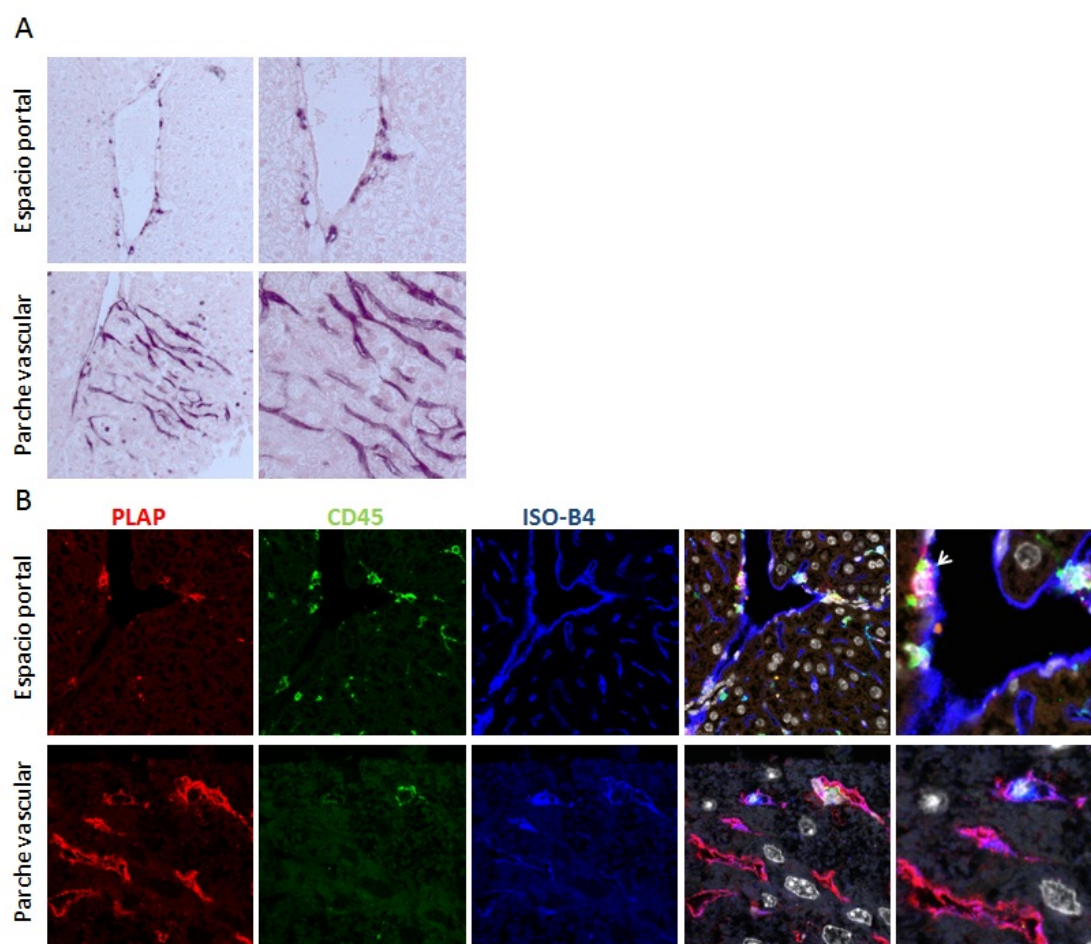


FIGURA 44. Injerto vascular de células de AGM de día 12.

A. Detección histoquímica de la actividad PLAP por tinción con NBT en secciones de hígado, señal dispersa y en forma de parche. B. Imágenes inmuno fluorescentes de secciones de hígado teñidas con anti-PLAP (rojo), anti-CD45 (verde), IsoB4 (azul) y 4',6-diamidino-2-phenylindole DAPI (gris) mostrando células alrededor de los vasos PLAP+CD45+ (punta de flecha) y un parche vascular PLAP+ IsoB4+ CD45-. Imágenes tomadas con microscopio Leica DM5000B a distinta magnificación 200x y 400x en A. Imágenes tomadas a distinto aumento (400xy Zoom 3,5 de fotos a 400x) en el microscopio confocal SPE Leica en B.

3.3 Caracterización del potencial de repoblación hemato-vascular: mapeo espacio/temporal durante el desarrollo del hígado y del AGM.

3.3.1 En el hígado

La especificación de las células de hígado se produce a día 9 de desarrollo acompañándose de una progresiva vascularización y aparición de células endoteliales sinusoidales alrededor del día 10 (Perez-Pomares, Carmona et al. 2004; Si-Tayeb, Lemaigre et al. 2010). Las primeras células sanguíneas se observan también alrededor del día 10. Entre el día 10-16 de desarrollo el hígado de ratón tienen una función primordialmente hematopoyética, de expansión de eritrocitos. Las células madre hematopoyéticas aparecen a día 11 de desarrollo y se expanden hasta 53 veces a día 12 (Kumaravelu, Hook et al. 2002). A partir de día 13 la frecuencia de CMHs disminuye frente a la expansión de eritrocitos y progresiva aparición de hepatoblastos (Si-Tayeb, Lemaigre et al. 2010). Para determinar en que momento del desarrollo del hígado embrionario aparece el potencial vascular trasplantable (TEPC) y si se mantiene posteriormente a día 12 de desarrollo, obtuvimos células de embriones y fetos a día 10, 11 y 14 de desarrollo. En la figura 45 se pueden observar imágenes de hígado fetal a día 10, 11, 12 y 14 donde se aprecia una gran diferencia en tamaño que se correlaciona con el número creciente de células en cada estadio (Tabla 32).

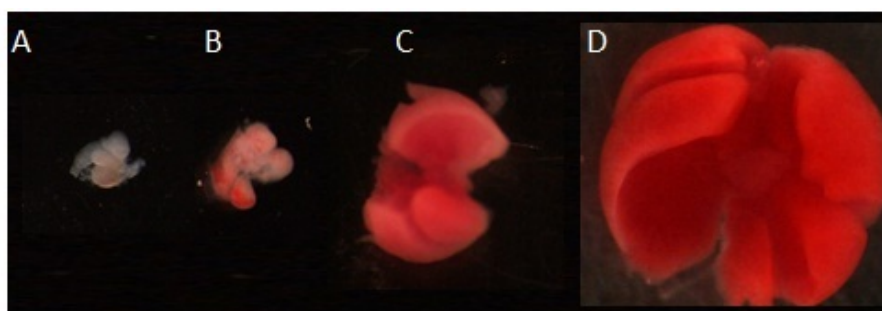


FIGURA 45. Hígado fetal a diferentes estadios de desarrollo.

(A) Día 10; (B) día 11; (C) día 12; (D) día 14. Las imágenes fueron tomadas a temperatura ambiente usando una lupa Leica MZ16 y una cámara Nikon COOLPIX. A una magnificación de x20

El análisis por FACS de células PLAP⁺ muestra que a partir de día 11 de desarrollo, el porcentaje de células PLAP^{brillantes+} en el hígado disminuye (69.3 ± 13 E11, 8.25 ± 3 E12 y 6.2 ± 2.1 E14) coincidiendo con la maduración de progenitores cKit⁺ y expansión de células eritroides

(Sanchez, Gottgens et al. 1999) (Figura 46). Sin embargo, mientras que la frecuencia de población PLAP+VE-Cad+CD45- se estabiliza alrededor del día 12 de desarrollo, observamos un incremento selectivo de la población de CMH VE-Cad+CD45+ dentro de la población PLAP+. Esta población se diluye grandemente en el hígado fetal E14. Nuestros datos indican que el vector SCL-PLAP, añade un paso más en el enriquecimiento de CMH en estos estadios de desarrollo (Tabla 32).

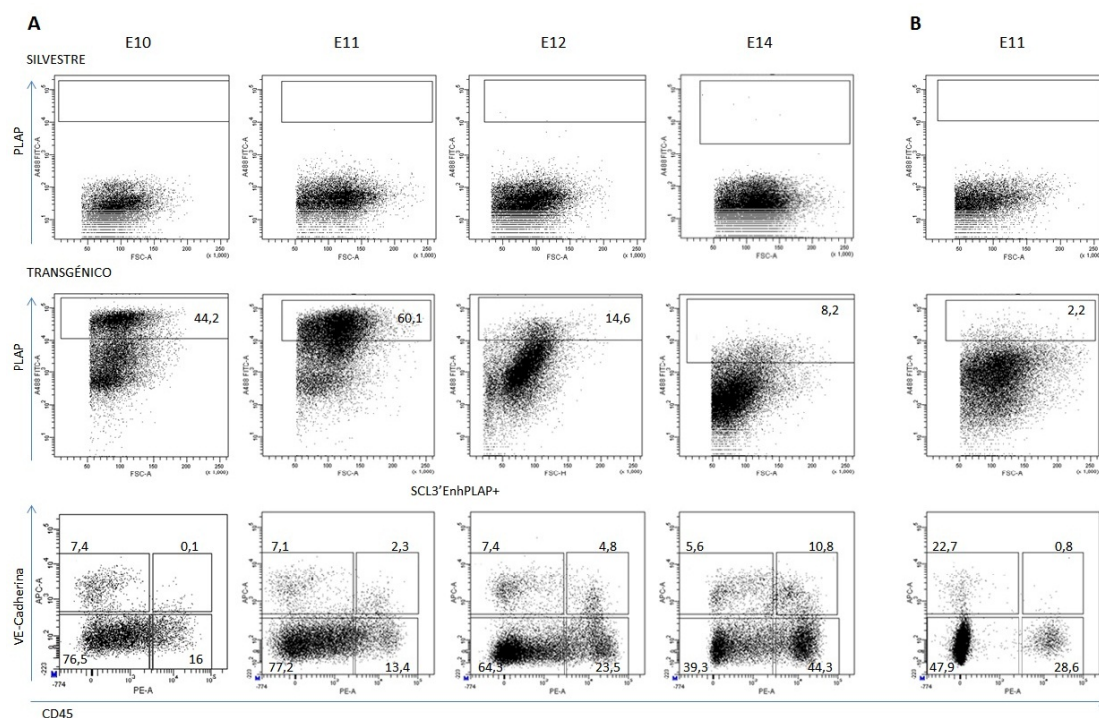


FIGURA 46. Análisis fenotípico comparativo de la expresión de VE-Cad y CD45 en la población PLAP+ en hígado fetal (panel A) y AGM (panel B) a diferente estadio de desarrollo embrionario.

Panel superior, células de embriones silvestres teñidas para el anticuerpo anti-PLAP. Panel intermedio, células de embriones transgénicos teñidas para el anticuerpo anti-PLAP. Panel inferior, gráfico que muestra solo la población seleccionada como SCL3'Enh-PLAP+ teñida para los anticuerpos CD45 y VE-Cadherina. Los porcentajes de cada cuadrante están referidos a la población PLAP+.

TABLA 32. Frecuencia de poblaciones PLAP+VE-Cad+CD45+ y PLAP+VE-Cad+CD45- en hígado fetal y AGM a diferente estadio de desarrollo embrionario.

Órgano	Edad del embrión	Nº células (x 10 ⁴)	% FACS-PLAP+	Porcentaje del fenotipo respecto a la población SCL3'EnhPLAP+ (rango)			
				VE-Cad+CD45-	VE-Cad+CD45+	VE-Cad-CD45+	VE-Cad-CD45-
Hígado fetal	E10	0.4 ± 0.0	45 ± 2.1	7.4 ± 2.9	0.1 ± 0.1	16.06 ± 1.8	76.4 ± 1.9
	(n=8)		(42.6-46.6)	(4.2-9.9)	(0-0.1)	(13.9-17.2)	(74.7-78.5)
	E11	14 ± 3	69.3 ± 13	6.1 ± 1.4	2.1 ± 1.2	11.9 ± 3.5	80.9 ± 4.6
	(n=6)		(60.1-78.5)	(5.1-7.1)	(1.2-2.9)	(9.5-14.5)	(84.2-77.7)
	E12	130 ± 40	8.25 ± 3	8.1 ± 1.5	3.6 ± 1.4	24.9 ± 1.2	66.5 ± 10.6
	(n=8)		(5.8-14.6)	(6.2-9.5)	(2-4.8)	(23.5-25.8)	(56.9-81.6)
AGM	E14	2.725 ± 69	6.2 ± 2.1	8.04 ± 2.7	11.6 ± 3.6	37.1 ± 16.5	43.8 ± 17.8
	(n=5)		(4.1-8.2)	(5.6-10.9)	(8.4-15.6)	(18.3-48.7)	(28.8-63.5)
AGM	E11	25 ± 2	2.3 ± 0.1	21.6 ± 0.9	0.5 ± 0.3	28.1 ± 0.6	48.5 ± 1.8
	(n=5)		(2.2-2.4)	(20.9-22.7)	(0.2-0.9)	(27.7-28.6)	(47.2-49.8)

Para analizar la capacidad de repoblación hemato-vascular en trasplantes en recién nacidos, células obtenidas del hígado fetal a día 10 de desarrollo fueron co-trasplantaron con células de médula ósea adulta LacZ (MO_{LacZ}) para confirmar la eficiencia de trasplantes, ya que la frecuencia de CMH es nula en estos estadios (Kumaravelu, Hook et al. 2002). Consecuentemente, ninguno de los 13 animales trasplantados con hígado fetal de día 10 presentaba repoblación hematopoyética PLAP+ en sangre periférica. Los 9 animales con señal LacZ+ en circulación fueron seleccionados para análisis de repoblación vascular en hígado, no detectándose ninguna señal NBT+ (Tabla 33 y 34).

5 de los 6 animales trasplantados con células de hígado fetal de día 11 de desarrollo presentaban quimerismo hematopoyético en sangre periférica (PCR-PLAP+, 4.9-18% FACS-PLAP+) (Tabla 33). Así mismo, secciones de hígado mostraban presencia de parches vasculares en los 6 animales y señal dispersa hemato-vascular alrededor de los vasos en las 5 quimeras hematopoyéticas. No se observó señal dispersa en la quimera no hematopoyética (Figura 47). La cuantificación de la contribución vascular rinde unos valores medios para los 6 animales de 3.49 ± 1.3 número de parches/cm², estadísticamente similar al obtenido en animales trasplantados con las células de hígado fetal de día 12, de 3.93 ± 2.01 parches/cm² (Tabla 34).

Para determinar si la capacidad de formación de parches vasculares se mantiene posteriormente a día 12 de desarrollo, se trasplantaron células de hígado de fetos E14. Un número de células equivalente a 0.2 embriones (5 x 10⁶ células) se trasplantaron por receptor. 6 animales de 6 trasplantados presentaban quimerismo hematopoyético en sangre

periférica (1-13% FACS-PLAP) (Tabla 33). Sin embargo, solo 4 de estos 6 presentaban parches vasculares con un rendimiento de 2.23 ± 0.69 parches/cm² (Tabla 34).

Estos datos indican que la aparición de actividad TEPC en hígado fetal se detecta a día 11 de desarrollo, coincidente con un incremento de células VE-Cad+CD45-. El nivel de repoblación vascular (formación de parches vasculares en hígado) es semejante al detectado en células procedentes de embriones de día 12 de desarrollo. Coincidiendo con que el número de células PLAP+VE-Cad+CD45- por órganos es muy parecido ($5-8 \times 10^3$ células PLAP+VE-Cad+CD45- por órgano) Esta actividad continúa en estadios posteriores, con una disminución de la frecuencia, posiblemente relacionada con la masiva expansión de eritrocitos (Figura 48).

Por tanto la actividad de repoblación vascular TEPC en el hígado fetal aparece después del estadio E10 y se extiende más allá del estadio E12.

TABLA 33. Frecuencia de repoblación hematopoyética en quimeras trasplantadas con hígado fetal a diferente estadio embrionario.

Estadio embrionario de Hígado fetal donante	Nº de células trasplantadas/ receptor (x10 ⁶)	ee/ receptor	Nº ratones PLAP+ en sangre/ Nº ratones trasplantados	% FACS-PLAP+ en sangre (rango)
E10 +MO _{LacZ}	0.09-0.14	2-4	0/13*	0
E11	0.25-0.5	2-4	5/6	10.6±6.7 (4.9-18)
E12	1.3	1	5/5	5.04±2.5 (1.6-8.2)
E14	5	0.2	6/6	6.1±5.7 (1-13)

Células de hígado fetal de diferente estadio de desarrollo fueron trasplantadas solas o en presencia de células de médula ósea de adulto con el marcador genético lacZ (MO_{LacZ}). A los 5 meses se determina el porcentaje de células PLAP+ en circulación por análisis FACS y se calcula la media de aquellos que son positivos * 9 de 13 animales co-trasplantados con células de hígado fetal de día 10 y MO_{LacZ} presentan señal LacZ en sangre y fueron analizados para contribución vascular.

TABLA 34. Frecuencia de repoblación vascular en hígado de quimeras trasplantadas con hígado fetal a diferente estadio de desarrollo.

Célula donante Hígado	Quimera	% Vasos con células PLAP+	Área total analizada (cm ²)	Nº de parches PLAP+	Área de parches PLAP+(cm ²)	Nº parches PLAP+/cm ²	Área de parches PLAP+/cm ² (x 10 ⁻⁵)
E10	MEDIA (n=9)	0	10.1±3.6 (suma=70.4)	0	-	-	-
E11	1 (7041)	16.3	9.8	36	0.012	3.67	130.5
	2 (7046)	0	9.8	32	0.011	3.26	110.9
	3 (7195)	15	11	13	0.003	1.18	23.4
	4 (7198)	23.2	10.4	36	0.015	3.45	147.4
	5 (7728)	18	9.8	49	0.016	4.99	169.8
	6 (7729)	19.3	9.8	43	0.014	4.38	149.1
	MEDIA (n= 6)	15.2 ±8	10.1±0.5	34.8±12.2	0.012±0.005	3.49±1.3	121.8±52.1
			Suma (70.5)				
E12	MEDIA (n=5)	10.6±8.6	6.37±1.66 (suma=31.8)	27±18.6	0.0087±0.0053	3.93±2.01	134.13±76.80
E14	1 (6551)	14.5	5.4	12	0.004	2.22	74.1
	2 (6552)	10.3	6.6	16	0.005	2.43	82.5
	3 (6554)	13.2	4.8	7	0.002	1.46	49.6
	4 (6555)	9.8	3.5	10	0.003	2.81	95.7
	MEDIA (n=4)	12±2.2	5.1±1.2	11.3±3.7	0.004±0.0012	2.23±0.6	75.5±19.4
			Suma (20,4)				
	MEDIA (n=2)	10-5.2	7.3-5.4	0	-	-	-
			Suma (12.8)				

En secciones de hígado teñidas con NBT se contabiliza el número de vasos sanguíneos con células PLAP+ a su alrededor respecto del total de vasos sanguíneos de mediano calibre por el que está compuesto cada sección, representándolo en porcentaje. Por el método de acotamiento zonal de área descrito en materiales y métodos se calcula el área total de tejido analizado, el número de parches y la suma del área de parches. Con estos valores calculamos el número y extensión de área relativa de los parches vasculares para cada quimera. La media y desviación estándar de los datos obtenidos son los resultados de contribución vascular. Se muestran también los valores medios para quimeras trasplantadas con hígado fetal de día 12, desarrollado en la Tabla 14 (Capítulo 1).

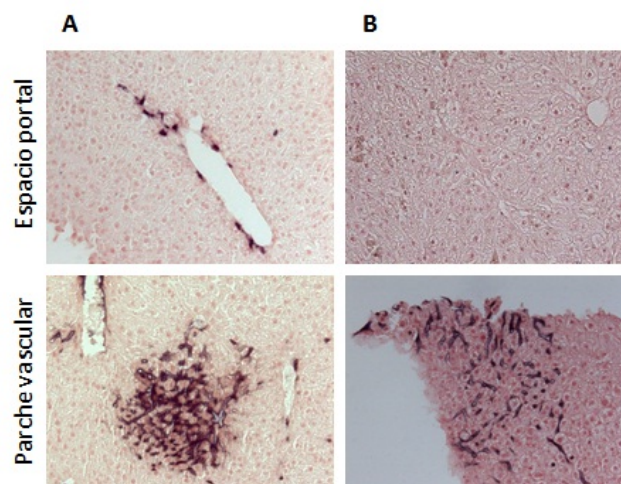


FIGURA 47. Injerto vascular de células de hígado fetal de E11 en una quimera hematopoyética (A) y otra no hematopoyética (B).

Se observa una diferencia en cuanto a señal dispersa alrededor de los vasos, ya que no se detecta en la quimera no hematopoyética. La señal en forma de parche aparece en ambas. Imágenes tomadas con microscopio Leica DM5000B a un aumento de 200x.

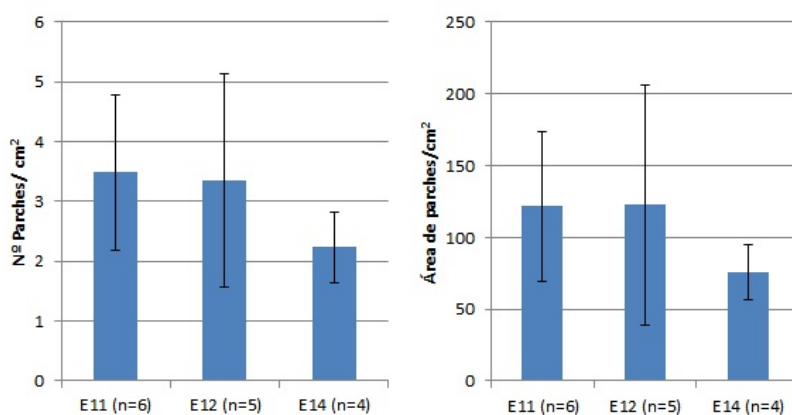


FIGURA 48. Gráfico resumen de frecuencias de injerto vascular en forma de parche de células de hígado fetal a diferente estadio de desarrollo.

En el eje X representamos el tipo de células de hígado fetal según el estadio de desarrollo que después del trasplante generan parche en secciones de hígado (n= número de animales con parche). En el eje Y representamos el número y el área de parches por centímetro cuadrado analizado. La actividad de repoblación vascular en trasplante se encuentra a partir de día 11, siendo similar a la del día 12 y disminuyendo a día 14.

3.3.2 En el AGM

Considerando que células de hígado fetal E11 presentaban un fuerte potencial de repoblación vascular, decidimos indagar si también este incremento se podía observar en células obtenidas de la región de AGM E11 con respecto a la región AGM E12. En este punto de desarrollo hay un gran incremento de CMH VE-Cad+CD45+ en el AGM (Taoudi, Morrison et al. 2005). El AGM E11 presenta un $2.3 \pm 0.1\%$ de célula PLAP^{brillantes+}, de las cuales el $0.5 \pm 0.3\%$ co-expresan VE-Cad+CD45+, y por tanto son CMH. Así mismo el $21.6 \pm 0.9\%$ presenta un fenotipo VE-Cad+CD45- (Tabla 32, Figura 46).

Para determinar la actividad de repoblación hemato-vascular de las células del AGM E11, un número de células equivalente a 1-4 embriones de AGM se trasplantaron a recién nacidos. A los 5-6 meses post trasplante se determinó la presencia de células donantes en sangre periférica. 8 de 17 animales trasplantados presentaban quimerismo hematopoyético a largo plazo en sangre, determinado por PCR-PLAP y FACS-PLAP (Tabla 35). Determinación de células PLAP+ en secciones de hígado de estos 8 animales demostraba que presentaban actividad dispersa y peri-vascular portal, incluyendo células endoteliales. Sin embargo no se detectaron parches vasculares en hígado (Tabla 36).

Concluimos, por tanto, que el AGM de día 11 no presenta actividad TEPC, pero sí contiene actividad peri-vascular portal.

TABLA 35. Frecuencia de repoblación hematopoyética de quimeras trasplantadas con AGM E11.

Célula donante	Nº de células trasplantadas/ receptor ($\times 10^6$)	ee/ receptor	Nº ratones PLAP+ en sangre/ Nº ratones trasplantados	% FACS-PLAP+ en sangre (rango)
AGM E11	0.2-0.8	1-4	8/17	6.2 ± 5.9 (1.5-15.7)

Células de AGM E11 fueron trasplantadas. A los 5 meses se determina el porcentaje de células PLAP+ en circulación por análisis FACS y se calcula la media de aquellos que son positivos

TABLA 36. Frecuencia de repoblación vascular en hígado de quimeras trasplantadas con AGM E11.

Célula donante	Quimera	% Vasos con células PLAP+	Área total analizada (cm^2)	Nº de parches PLAP+	Área de parches PLAP+ (cm^2)	Nº parches PLAP+/ cm^2	Área de parches PLAP+/ cm^2 ($\times 10^{-5}$)
AGM E11	MEDIA (n=8)	25.3 ± 4.5 (21-30)	9.5 ± 2 Suma=85.3	0	-	-	-

En secciones de hígado teñidas con NBT se contabiliza el número de vasos sanguíneos con células PLAP+ a su alrededor respecto del total de vasos sanguíneos de mediano calibre por el que está compuesto cada sección, representándolo en porcentaje. Por el método de acotamiento zonal de área descrito en materiales y métodos se calcula el área total de tejido analizado. Este tipo de quimeras no presentaban parches vasculares.

3.3.2.1 Potencial de diferenciación vascular en otros órganos: riñón y corazón

Cuando realizamos el análisis de secciones de riñón y corazón de quimeras hematopoyéticas trasplantadas con AGM de día 11 o 12, observamos parches en ambos órganos, independientemente de la presencia de parches vasculares en el hígado de las mismas (Figura 49, Tabla 37). Estos resultados apoyan la idea de que las células responsables de generación de parches en riñón o corazón tiene una naturaleza diferente a los progenitores TEPC.

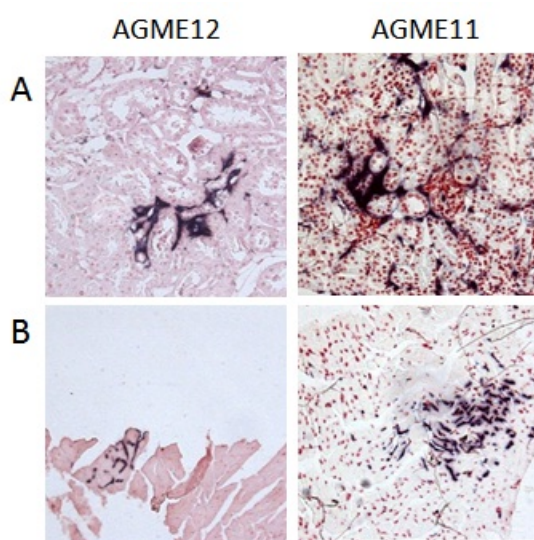


FIGURA 49. Repoblación vascular de células de AGM en secciones de riñón (A) y corazón (B).

Detección de la actividad PLAP+ mediante tinción NBT en quimeras trasplantadas con AGM E12 y AGM E11. El injerto vascular en forma de parche se observa en ambos órganos. Imágenes tomadas con microscopio Leica DM5000B a un aumento de 200x.

TABLA 37. Frecuencia de repoblación vascular en riñón y corazón de quimeras trasplantadas con células de AGM

Células donantes	Nº ratones con parche en riñón/ Nº ratones PLAP+ en sangre	Nº ratones con parche en corazón/ Nº ratones PLAP+ en sangre
AGM E12	2/4*	2/4*
AGM E11	3/4	2/4

* Análisis de las 4 quimeras que presentan parches vasculares en hígado

3.4 Localización espacial de precursores hemato-vasculares PLAP+ en embriones de día 11

Para determinar la relación espacial de las diferentes poblaciones PLAP+ y determinar si había una co-localización entre las células que expresaban el marcador hematopoyético CD45 y el vascular CD31 (empleado aquí en vez del anticuerpo anti VE-Cadherina, ya que ambos presentan una distribución similar (Zovein, Hofmann et al. 2008)) , realizamos tinciones de embriones enteros y análisis por confocal en 3D de alta resolución en colaboración con el grupo de Dr. Dzierzak en Rotterdam (Yokomizo and Dzierzak 2010).

Resultados preliminares (no cuantificados) muestran una distribución de PLAP en toda la vasculatura sinusoidal hepática, similar a la distribución de CD31 (Figura 50 A, B). Así mismo se pueden observar células CD45+ dispersas por toda la sección. Algunas expresan PLAP y bajos niveles de CD31 (Figura 50B asterisco), por tanto potenciales CMH PLAP+CD31+CD45+. También se observan de forma dispersa células redondeadas PLAP+CD31+CD45-, (Figura 50B flecha). En este punto no podemos determinar si la actividad TEPC está asociada a las células integradas en la estructura vascular o las células redondeadas. Hacemos notar, que la suspensión celular de hígado fetal se obtiene por disgregación mecánica (no enzimática), y por tanto parte de la actividad TEPC podría asociarse a las células redondeadas.

En el AGM una expresión débil de PLAP se observa en todo el endotelio de la aorta dorsal y células redondeadas emergentes del endotelio formando grupos celulares (con expresión más prominente). Estas agrupaciones celulares se consideran representativas de la presencia de células CMHs. Como se observa en la figura 50C la agrupación celular está compuesta de células PLAP+CD31+CD45+ y PLAP+CD31+CD45- (flecha). En este punto no podemos distinguir si estas células son pre-CMHs (VE-Cad+CD41+CD45+) u otro tipo de progenitores (McKinney-Freeman, Naveiras et al. 2009; Rybtsov, Sobiesiak et al. 2011).

En trabajos futuros se aplicarán más marcadores para distinguir la población TEPC en el hígado y potencialmente AGM.

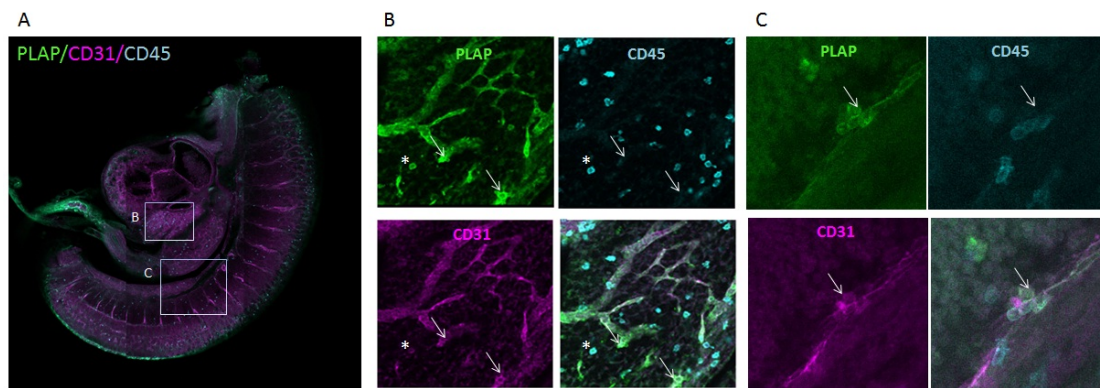


FIGURA 50. Localización de progenitores hemato-vasculares en embriones de día 11.

Análisis por confocal en 3D de alta resolución para la expresión de PLAP, CD31 y CD45. (A) embrión entero. (B) hígado fetal (C) aorta. El asterisco en B indica células PLAP+CD45+CD31+, las flechas células PLAP+CD45-CD31+. Imágenes analizadas con un microscopio confocal (Zeiss LSM 510 Meta, Plan-Neofluar 20 / NA 0,5, Achroplan 40 / NA 0,8 W, Achroplan 63 / NA 0.95W) mediante el uso de multi-pista en modo secuencial con un aumento de 20x y 100x.

4. SISTEMAS DE CULTIVO PARA PROGENITORES TEPCs

Un aspecto importante, dentro del estudio de células progenitoras, es el establecimiento de sistemas de cultivo para su generación/expansión, así como ensayos de diferenciación in vitro. En este capítulo describiremos las dos estrategias empleadas: 1-cultivo de explantes en inter-fase líquido/gas, 2- co-cultivo con la línea celular OP9 como ensayo de diferenciación para células formadoras de túbulos vasculares.

4.1 Explantes de hígado fetal para expansión/generación de actividad hemato-vascular

Los progenitores PLAP+VE-Cad+ en el hígado fetal presentan características de células inmaduras (cKit+CD34+). Los sistemas de cultivo hasta ahora descrito para progenitores endoteliales inmaduros procedentes de localizaciones hematopoyéticas (circulación, cordón umbilical, médula ósea), permiten expandir poblaciones como las ECFCs (*endothelial colony-forming cells*). Estos progenitores, aunque pueden formar túbulos en ensayos con matrigel, tienen un potencial muy limitado de integrarse en vasos una vez trasplantados (Yoder, Mead et al. 2007). Por tanto, nuestra elección de sistema en cultivo fue el de uno que mantuviese las células progenitoras en un estatus que posteriormente pudieran ser trasplantadas. El sistema hematopoyético ofrece uno de estos sistemas, el de cultivo de explantes-AGM en inter-fase líquido/aire, que permite el mantenimiento y expansión de células madre hematopoyéticas preservando su potencial de repoblación (Medvinsky and Dzierzak 1996). Además el medio se ha empleado para expansión de progenitores mieloides y células estromales (Fraser, Eaves et al. 1990). Este sistema de cultivo empleado con hígado, permite mantener a las CMHs, aunque no su expansión. Sin embargo, esto no excluye la posibilidad de que tenga un potencial en la expansión de otros tipos de progenitores. Para determinar la capacidad de generar/expandir células TEPC en cultivo de explantes de hígado fetal de E11 siguiendo protocolos previamente descritos en el laboratorio de la Dr. Dzierzak (empleando MyeloCult® M5300 suplementado con hidrocortisona,) grupos de órganos procedentes de embriones transgénicos SCL3'EnhPLAP+ se cultivaron en la inter-fase líquido aire durante 4 días. Posteriormente se homogeneizaron y se trasplantaron a ratones recién nacidos tratados con busulfán (2-4 ee por receptor, Tabla 38). A los 4 meses post trasplante se determinó la capacidad de repoblación hematopoyética y formación de parches vasculares en secciones de hígado. En paralelo también se trasplantaron células de cultivo

de explantes de AGM E11. Solo uno de los 9 animales trasplantados con células de hígado fetal E11 cultivado presentaba repoblación hematopoyética. Sin embargo, todos los animales trasplantados con AGM cultivadas (6 animales de 6) presentaban células donantes PLAP+ en circulación, confirmando datos de otros autores que indican el incremento de actividad CMH en cultivos AGM pero no en cultivos de hígado fetal (Ling, Ottersbach et al. 2004) (Tabla 38).

El análisis de repoblación vascular en quimeras de hígado fetal de E11 cultivadas solo rindió un animal positivo. Con lo cual se produce una drástica reducción respecto a la capacidad de formación de parches de las células sin cultivar del hígado fetal de E11 (Tabla 39). Por tanto, los explantes de hígado fetal de E11, no parecen adecuados para la generación y / o expansión de progenitores TEPC. Sorprendentemente, dos de los 6 animales trasplantados con células de explantes de AGM E11 presentaban parches vasculares en el hígado, lo cual representa un importante incremento sobre la capacidad de las células de AGM E11 sin cultivar (Tabla 39, Figura 51). Este incremento de funcionalidad iba acompañado de un incremento en el porcentaje de células PLAP+ del AGM post cultivo. Sin embargo, el marcador VE-Cadherina no se incrementa (Figura 52).

Por consiguiente, los explantes de AGME11 constituyen un potencial sistema para la generación y/o expansión de precursores TEPCs. Trabajos futuros permitirán confirmar el incremento de frecuencia y potenciales factores determinantes de la aparición de actividad TEPCs en AGM E11.

TABLA 38. Frecuencia de repoblación hematopoyética en quimeras trasplantadas con células cultivadas de hígado fetal o AGM

Célula donante	Nº de células trasplantadas/ receptor (x10 ⁶)	ee/ receptor	Nº ratones PLAP+ en sangre/ Nº ratones trasplantados	% FACS-PLAP+ en sangre (rango)
Hígado fetal E11 cultivado	0.08-1	2-4	1/9	11.4
Hígado fetal E11	0.25-0.5	2-4	5/6	10.6±6.7 (4.9-18)
AGM E11 Cultivado	0.3	2.5	6/6	11.6±2.5 (9.5-13.4)
AGM E11	0.2-0.8	1-4	8/17	6.2±5.9 (1.5-15.7)

Células de hígado fetal y AGM cultivadas durante 4 días fueron trasplantadas. A los 5 meses se determina el porcentaje de células PLAP+ en circulación por análisis FACS y se calcula la media de aquellos que son positivos. Se muestran de nuevo los datos obtenidos en el trasplante de hígado fetal y AGM E11 sin cultivar para comparar los resultados.

TABLA 39. Frecuencia de repoblación vascular en hígado de quimeras trasplantadas con células cultivadas de hígado fetal o AGM

Célula donante	Quimera	Área total analizada (cm ²)	Nº de parches PLAP+	Área de parches PLAP+(cm ²)
Hígado E11 cultivado	1 (7885)	7.3	4	0.54
	MEDIA (n=8)	7.3±1	0	-
		Suma=51.5		
Hígado E11	MEDIA (n= 6)	10.1±0.5	34.8±12.2	3.49±1.3
		Suma (70.5)		
AGM E11 cultivado	1 (7887)	7.3	13	1.76
	2 (7890)	7.3	1	0.14
	MEDIA (n=4)	7.3±1	0	-
		Suma=29.4		
AGM E11	MEDIA (n=8)	9.5±2	0	-
		Suma=85.3		

En secciones de hígado teñidas con NBT se contabiliza por el método de acotamiento zonal el área analizada y el número de parches para cada quimera. Se muestran también los valores medios para quimeras trasplantadas con hígado fetal y AGM E11 sin cultivar.

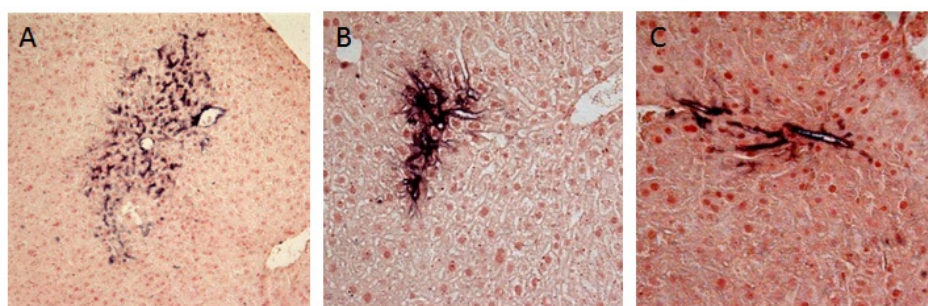


FIGURA 51. Repoblación vascular en forma de parche en quimeras trasplantadas con AGM E11 cultivado.

Por detección histoquímica de la actividad PLAP mediante NBT en secciones de hígado se pueden observar parches vasculares. Aquí se muestran fotos representativas de tres parches, (A) y (B) de la quimera 1 (7887) y (C) de la quimera 2 (7890), tabla 26. Fotos tomadas con el microscopio Leica DM5000B a un aumento de 100x (A) y 200x (B) y (C).

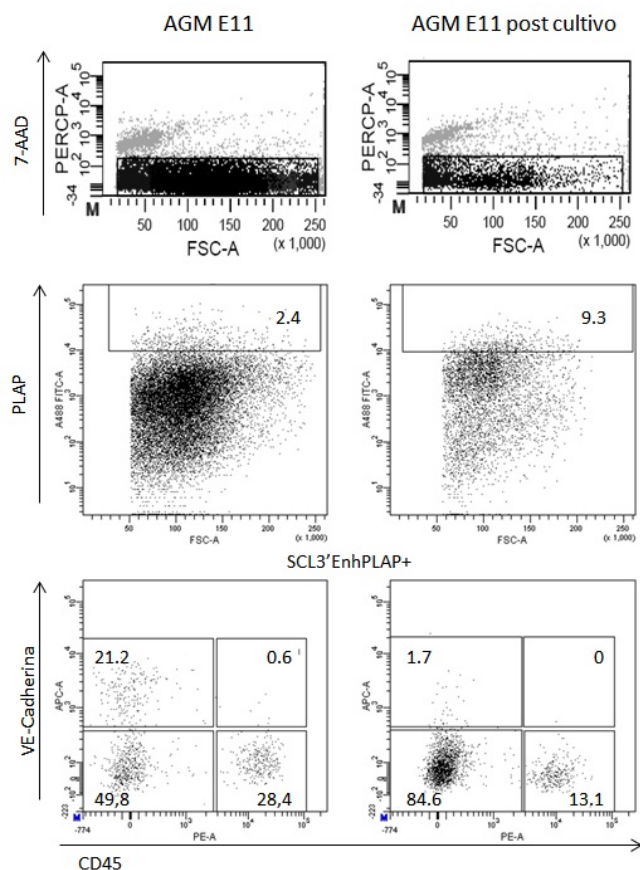


FIGURA 52. Análisis fenotípico comparativo de la expresión de PLAP, VE-Cad y CD45 en la población de AGM E11 no cultivadas y cultivadas.

Panel superior, células de embriones transgénicos teñidos para el marcador 7-AAD para la selección de células vivas. Panel intermedio, células vivas teñidas con el anticuerpo anti-PLAP. Panel inferior, gráfico que muestra solo la población seleccionada como SCL3'Enh-PLAP+ teñida para los anticuerpos CD45 y VE-Cadherina. Los porcentajes de cada población están referidos a la población PLAP+. Se observa que la población de células vivas después del cultivo decrece, pero dentro de esta hay un incremento de células PLAP+ así como una disminución del marcador endotelial.

4.2 Ensayo de diferenciación endotelial: células formadoras de túbulos vasculares en co-cultivos con la línea celular OP9.

Ha sido descrito por otros autores un método de cultivo que permite analizar el comportamiento de los progenitores endoteliales y su expansión mediante el co-cultivo con la línea celular OP9 en presencia de VEGF (Nishikawa, Nishikawa et al. 1998; Hirashima, Kataoka et al. 1999). Este sistema funciona para todos los progenitores VE-Cad+ durante el desarrollo de ratón, incluyendo los derivados de Células Madre Embrionarias (ESCs). En particular se ha demostrado para los precursores obtenidos de saco vitelino y AGM (Nishikawa, Nishikawa et al. 1998; Taoudi, Morrison et al. 2005). En esta sección queremos

determinar si las células de hígado fetal PLAP+VE-Cad+, que contienen la actividad TEPC, tienen el potencial de diferenciarse a células endoteliales in vitro y comparar esta capacidad con las células del AGM E11, que no poseen potencial TEPC.

Para ello, diferente número de células PLAP+VE-Cad+, PLAP+VE-Cad- y PLAP- seleccionadas por FACS junto con células no fraccionadas de AGM E11 e hígado fetal de E11 se co-cultivaron con células OP9 en presencia de VEGF (Figura 53A). A los 4 días del cultivo se pueden observar colonias endoteliales (Figura 53B). Para identificar y contar el número de colonias endoteliales, estas fueron teñidas con anticuerpo anti-CD31. En los pocillos se observó que la formación de colonias endoteliales estaba restringida mayormente a la fracción SCL3'EnhPLAP+ VE-Cad+ del hígado fetal y del AGM (Figura 53C). La fracción PLAP- no contiene actividad endotelial. La frecuencia de colonias es similar entre la población PLAP+ VE-Cad+ de hígado fetal y AGM (el cultivo de 6.000 células de hígado fetal PLAP+VE-Cad+ genera más de 50 colonias tubulares, el cultivo de 2.000 células de AGM PLAP+ VE-Cad+ forman una media de 30 colonias) (Tabla 40, Figura 54).

Por tanto, las células VE-Cad+ formadoras de parche derivadas del hígado fetal se comportan in vitro como otros precursores endoteliales que no poseen actividad TEPC. En el futuro, este sistema de cultivo permitirá analizar mecanismos moleculares y su correlación con la función de repoblación endotelial TEPC in vivo.

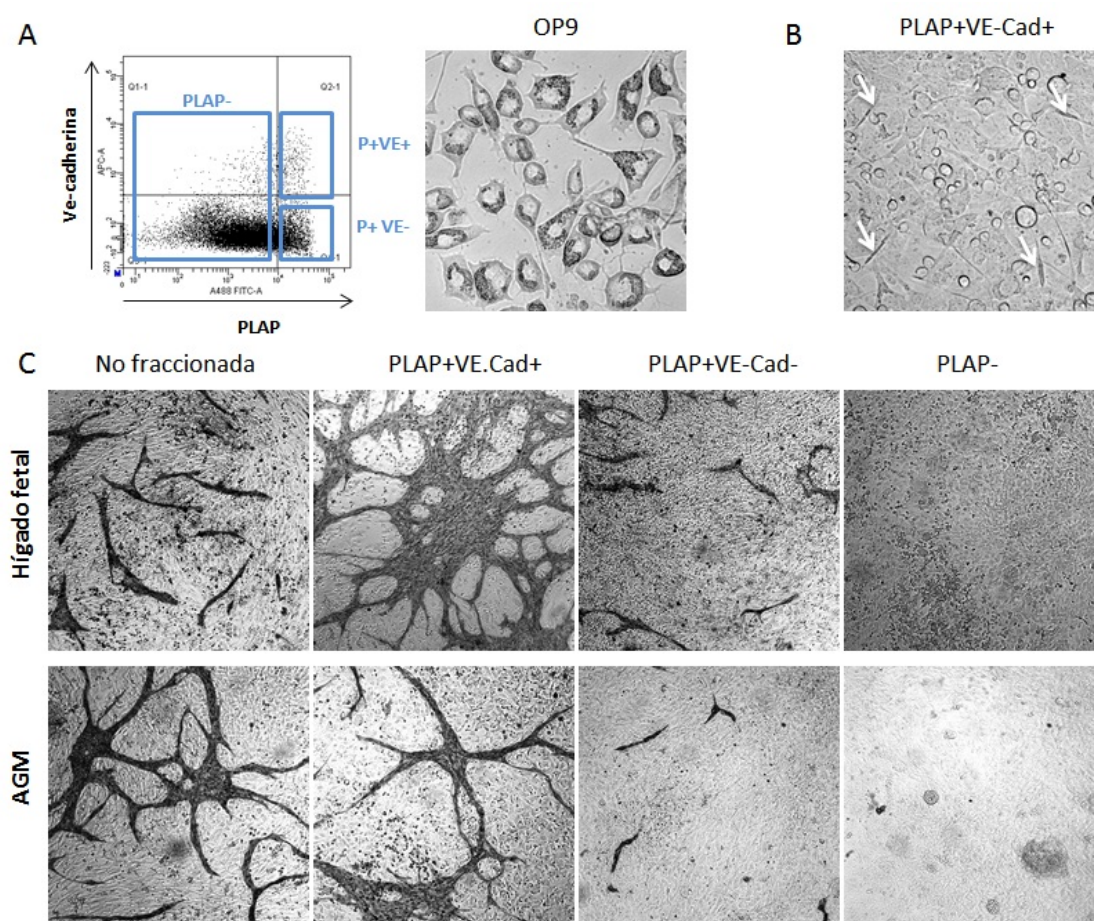


FIGURA 53. Potencial de diferenciación endotelial in vitro de fracciones de células de hígado fetal y de la región del AGM de E11.

A. Poblaciones de células seleccionadas por FACS para PLAP+VE-Cad+, PLAP+VE-Cad-, PLAP-, así como no fraccionadas de hígado fetal y AGM E11 se co-cultivaron con células OP9 al 80% de confluencia. B. Colonias endoteliales (flechas) después de 4 días de co-cultivo. C. Después de la tinción con anticuerpos CD31-rat, un anti-rat conjugado con biotina, estreptavidina peroxidasa y un sustrato DAB contra la peroxidasa se puede ver la formación de redes diferenciadas a endotelio. La formación de estas redes endoteliales está restringida a la población PLAP+ en ambos órganos. La mayoría de la actividad endotelial reside en la población PLAP+VE-Cadherina+. Estas redes también se observan en los cultivos de células no fraccionadas.

TABLA 40. Frecuencia de formación de colonias endoteliales en células PLAP+VE-Cad+ derivadas de hígado fetal y AGM E11.

Órgano	Población	Nº células/ placa	Nº colonias/placa	Nº colonias/ 10 ³ células
Hígado fetal E11	PLAP+VE-Cad+	6.000	50	8.3
	PLAP+VE-Cad-	200.000	8	0.04
	PLAP-	60.000	0	0
AGM E11	PLAP+VE-Cad+	2.000	30	15
	PLAP+VE-Cad-	30.000	0	0
	PLAP-	35.000	0	0

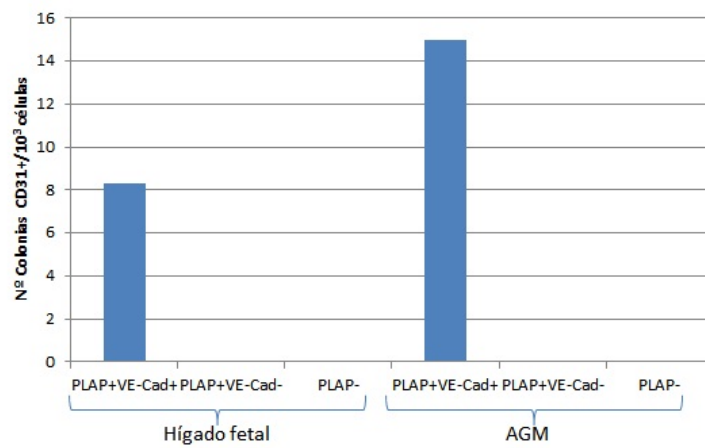


FIGURA 54. Frecuencia de colonias endoteliales derivadas de células disociadas de hígado fetal y AGM de día 11.

La formación de colonias endoteliales está restringida mayoritariamente a la fracción SCL3'Enh-PLAP+VE-Cad+ en ambos órganos. Con la población PLAP-no se observan este tipo de colonias.

5. ASPECTOS SOBRE LA REPOBLACIÓN VASCULAR DE CÉLULAS DE HÍGADO FETAL TRASPLANTADAS EN RECIÉN NACIDOS.

Una vez que hemos caracterizada la funcionalidad de las células de hígado fetal como fuente de progenitores endoteliales trasplantables es interesante establecer los parámetros de la cinética celular del injerto y el tipo de órganos que puede repoblar. Hay que considerar que el endotelio de los órganos no es solo un intercambiador de nutrientes o canal de tránsito celular, sino que forma una parte activa del nicho celular del órgano y que interviene en procesos de regeneración, embriogénesis y procesos tumorales (Nikolova, Strilic et al. 2007; Ding, Nolan et al. 2010). Por tanto, la manipulación de endotelio mediante el trasplante de progenitores puede ser de alta utilidad en posteriores estudios de manipulación celular/molecular y potencial aplicación biomédica.

5.1 Cinética de formación de parches vasculares

Para determinar cuándo aparecen los parches vasculares PLAP+ en las secciones de hígado de quimeras trasplantadas con hígado fetal de día 12 de desarrollo, analizamos el injerto vascular en quimeras hematopoyéticas a diferentes semanas post-trasplante (Tabla 41) cuantificando el número y el área total de parches.

A la semana y media post trasplante podemos observar células donantes injertadas en el hígado, pero no se observan parches. La aparición de parches la observamos a partir de las 3 semanas post trasplante, aunque la frecuencia es aún muy baja (solo 2 de 5 animales trasplantados). A partir de las 6 semanas se puede apreciar la presencia de parches PLAP+ en las secciones de hígado de todas las quimeras (Figura 55, Tabla 42). La frecuencia de número y área de parches no es estadísticamente diferente entre las 6 y 30 semanas post trasplante (Tabla 42), indicando que el parche vascular se estabiliza a partir de las 4-6 semanas y se mantiene durante toda la vida adulta del individuo.

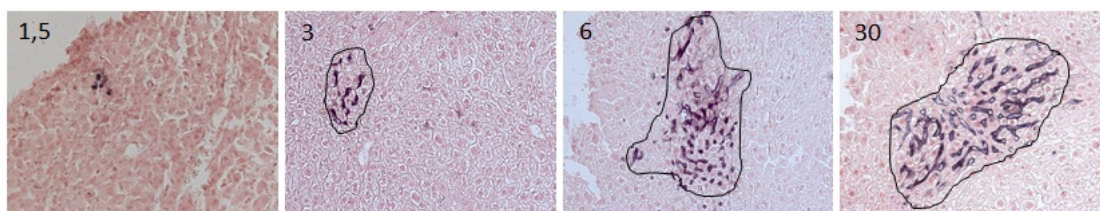


FIGURA 55. Repoblación vascular de hígado a diferentes semanas post trasplante.

Detección de células donantes PLAP+ mediante tinción NBT en secciones de quimeras trasplantadas con hígado fetal y analizado a la semana: 1.5, 3, 6 y 30. Con 1,5 semanas se observan células integradas sin formar parches. Células de hígado fetal se distribuyen formando parches vasculares PLAP+ a partir de la semana 3 con un tamaño inferior al observado a partir de la semana 6. A partir de este momento no hay diferencia significativa en cuanto al número y área de parche. Imágenes tomadas con el microscopio Leica DM5000B a un aumento de 200x.

5.2 Condicionamiento del receptor con busulfán.

El busulfan (*1, 4-butanediol dimethylsulphonate*) es un agente mieloablativo, utilizado para un eficiente injerto hematopoyético y también tiene cierto efecto de daño endotelial (Vassord, Lapoumeroulie et al. 2008), similar a la irradiación (Meng, Wang et al. 2003).

Cabe la posibilidad que nuestro sistema de trasplante en recién nacidos donde hay generación de nuevos vasos se cree un ambiente propicio para la repoblación vascular sin necesidad de administrar el busulfan, aunque no haya repoblación hematopoyética. Para resolver esta cuestión, decidimos realizar trasplantes en ratones recién nacidos sin tratamiento previo de busulfán y analizar el injerto vascular a corto y largo plazo.

Ningún animal mostraba repoblación hematopoyética en sangre periférica por análisis FACS-PLAP (Tabla 41). Analizamos el injerto vascular en todos los ratones trasplantados y encontramos parches vasculares en 2 de 4 animales analizados a las 7 semanas del trasplante y en todos los que analizamos a los 5 meses (3 de 3 animales) (Tabla 42). Estos datos indican que células de hígado fetal tiene capacidad de integrarse en el sistema vascular del hígado de un organismo recién nacido al mes del trasplante sin necesidad de provocar un daño en el mismo y formando parches vasculares que se mantiene durante la vida adulta. De acuerdo a lo obtenido en el punto anterior.

Además, la señal dispersa alrededor de los vasos que observábamos era muy escasa, confirmando nuestra teoría de que la repoblación hematopoyética está asociada a la contribución peri vascular de los vasos, por tanto, necesita del daño provocado por el busulfán para que se produzca el injerto.

Cuando comparamos los valores de cuantificación de contribución vascular de quimeras tratadas con busulfán con las no tratadas, 3.93 ± 2.01 número de parches/cm² y 1.6 ± 1 número de parches/cm², respectivamente, a los 5 meses post trasplante, observamos que

los valores son menores en los animales que no han sido tratados previamente con el busulfán. Esto indicaría que el busulfán favorece tanto la repoblación hematopoyética como la vascular ya que la frecuencia de injerto es relativamente mayor después de la administración del mismo.

Después de analizar secciones de riñón y corazón de las cinco quimeras que presentan parches vasculares en secciones de hígado observamos que dos de ellas también mostraban parches en riñón y corazón (Figura 56).

El hecho de que las células fetales tengan capacidad de integrarse en diferentes tejidos en un individuo no manipulado da idea de su gran potencial en trasplantes.

TABLA 41. Frecuencia de repoblación hematopoyética en quimeras de hígado fetal tratadas o no con busulfan y analizadas a diferente tiempo post trasplante

Condición del receptor	Tiempo post trasplante (semanas)	Nº ratones PLAP+ en sangre/ Nº ratones trasplantados	% FACS-PLAP+ en sangre (rango)
Recién nacido con busulfán	1.5	2/3	NC **
	3	2/5	2.9±0.7 (2.4-3.4)
	6	8/8	17.29±8.87 (1-27.2)
	30	11/11	7.9±3.6 (1.3-13.8)
Recién nacido sin busulfán	7	0/4	0.0 **
	30	0/3	0.0 **

Células de hígado fetal E12 fueron trasplantadas en recién nacidos tratado o no con busulfán y analizados a diferente tiempo post-trasplante. Se determina el porcentaje de células PLAP+ en circulación por análisis FACS y se calcula la media de aquellos que son positivos.

** PCR-PLAP+ en médula ósea y timo en dos animales del total trasplantados

TABLA 42. Frecuencia de repoblación vascular en hígado de quimeras de hígado fetal tratadas o no con busulfán y analizadas a diferente tiempo post trasplante

Condición del receptor	Tiempo post-trasplante (semanas)	Quimera	Área total analizada (cm ²)	Nº de parches PLAP+	Área de parches PLAP+(cm ²)	Nº parches PLAP+/cm ²	Área de parches PLAP+/cm ² (x 10 ⁻⁵)
Recién nacido con busulfán	1.5	MEDIA (n=3)	7.8±1 Suma=23.4	0	-	-	-
	3	FL-1	11	3	0.0018	0.36	16.36
		FL-2	10.1	2	0.0002	0.19	1.98
		MEDIA (n=3)	8.3±2 Suma=46	0	-	-	-
	6	1 (7808)	5.3	13	0.0128	2.44	240.3
		2 (7809)	6.1	39	0.0164	6.41	269.9
		3 (7957)	6.3	42	0.0353	6.69	562.7
		4 (7960)	6.6	33	0.0160	4.97	241.6
		5 (7961)	5.8	14	0.0065	2.38	109.9
		6 (7969)	8.6	50	0.0213	5.81	248.1
		7 (7811)	6.5	9	0.0018	1.38	26.9
		8 (7807)	5.6	9	0.0037	1.61	66.8
		MEDIA (n=8)	6.3±1 Suma=50.8	26.1±16.6	0.014±0.011	3.96±2.23	220.8±166.7
	30	MEDIA (n=5)	6.37±1.66	27±18.6	0.0087±0.0053	3.93±2.01	134.13±76.80
Nacido sin busulfán	6	1 (8362)	3.3	34	0.0064	10.18	191.6
		2 (8363)	3.3	10	0.0011	2.99	32.9
		n=2	4.2-6.6 Suma= 17.4	0	-	-	-
	30	1 (8357)	3.9	10	0.0022	2.53	55.2
		2 (8358)	3.9	2	0.0004	0.51	9.3
		3 (8359)	3.9	7	0.0008	1.77	20.9
		MEDIA (n=3)	Suma= 11.7	6.3±4	0.001±0.0009	1.6±1	28.5±23.8

Secciones de hígado teñidas con NBT son cuantificadas por acotamiento zonal de área descrito en materiales y métodos. Se calcula el área total de tejido analizado, el número de parches y la suma del área de parches. Con estos valores calculamos el número y extensión de área relativa de los parches vasculares para cada quimera. La media y desviación estándar de los datos obtenidos son los resultados de contribución vascular. Se muestran también los valores medios para quimeras analizadas a las 30 semanas (5 meses), desarrollado en la Tabla 14 (Capítulo 1).

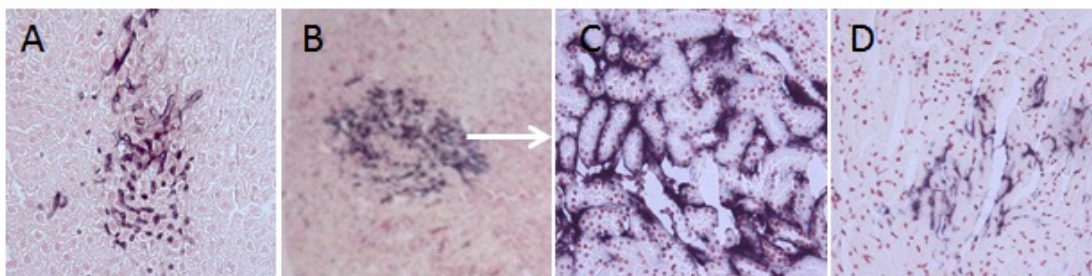


FIGURA 56. Repoblación vascular de hígado (A), riñón(B) (C) y corazón (D) de células de hígado fetal trasplantadas en individuos no tratados con busulfán.

Detección de células donantes PLAP+ mediante tinción NBT. Las células se distribuyen formando parches en todos los órganos analizados. Fotos tomadas con el microscopio Leica DM5000B a un aumento de 200x (A, C y D) y 100x (B).

DISCUSIÓN

La identificación de células madre y progenitores con capacidad de repoblar diferentes tejidos y órganos es un tema de alto interés en terapia celular y medicina regenerativa. Tanto el origen celular como el sistema de trasplante elegido son elementos críticos que determinan el potencial de diferenciación y repoblación de la célula donante. Nuestro trabajo contribuye a caracterizar el potencial vascular y hematopoyéticos de poblaciones celulares embrionarias en trasplantes. Determinamos que descendientes de poblaciones hematopoyéticas residen en localizaciones peri-vasculares y contribuyen al endotelio portal y describimos una población endotelial fetal capaz de repoblar la microvasculatura sinusoidal hepática.

Progenitores fetales versus adultos

En el primer capítulo de resultados demostramos que, trasplantando poblaciones celulares que contienen el mismo número de células progenitoras para el marcador hemato-vascular SCL3'EnhPLAP del hígado fetal y de la medula ósea de adulto, obtenemos una incrementada contribución vascular cuando las células son de origen fetal. Las células fetales, al igual que las de adulto contribuyen a células peri-vasculares y endotelio de grandes vasos (señal dispersa). Además, son capaces de formar parches vasculares de microvasculatura sinusoidal hepática, actividad no presente en células derivadas de medula ósea. ¿Qué factores pueden influir en el potencial vascular diferencial de las células fetales y las adultas?.

Previamente otros grupos habían demostrado que diversas poblaciones de hígado fetal poseen mayor capacidad intrínseca de injerto y repoblación que sus homologas adultas. Esto se ha demostrado en procesos de repoblación de células madre hematopoyéticas (Rebel, Miller et al. 1996; Bowie, Kent et al. 2007) y de precursores de parénquima hepático fetales (Dabeva, Petkov et al. 2000; Oertel, Menthen et al. 2006). Aunque los mecanismos no se conocen, hay una serie de características que poseen los progenitores hematopoyéticos fetales que no están presentes en los progenitores de adulto. Así las células madre hematopoyéticas de hígado de embriones de estadio E12-14 presentan una mayor capacidad proliferativa mientras que las adultas son mayoritariamente quiescentes (Bowie, Kent et al. 2007). Esta característica podría darles cierta ventaja en la repoblación a corto tiempo. Otra característica de las CMHs de hígado fetal es la expresión de receptores mediadores de interacción con endotelio, no presentes en CMHs de adulto. Por ejemplo, las CMHs de hígado fetal expresan Mac-1 (Morrison, Hemmati et al. 1995; Sanchez, Holmes et al. 1996) , una $\beta 2$ integrina involucrada en la interacción leucocito- endotelio y leucocito

matriz extracelular durante el anidamiento de progenitores endoteliales (Chavakis, Aicher et al. 2005) y la inflamación (Orlova, Choi et al. 2007). Más relevante puede ser la característica de que las CMHs fetales en trasplante generan diferentes tipos celulares y en diferente proporción comparado con las adultas. Así se ha descrito que en trasplantes, generan subpoblaciones específicas de linfocitos B1 (Kikuchi and Kondo 2006; Yoshimoto, Montecino-Rodriguez et al. 2011), linfocitos T (Ikuta, Kina et al. 1990) y favorecen la producción de células mieloides (Pina and Enver 2007; Klimchenko, Di Stefano et al. 2011). Considerando que en el individuo adulto hay poblaciones hematopoyéticas de naturaleza pro-angiogénica, tanto mieloides (De Palma, Venneri et al. 2005; Bailey, Willenbring et al. 2006; Grunewald, Avraham et al. 2006) como linfocitos T (Hur, Yang et al. 2007), cabe la posibilidad de que el origen de alguna de estas poblaciones sean células hematopoyéticas entre las que se incluirían CMHs, CPH o células efectoras mieloides fetales (Schulz, Gomez Perdiguero et al. 2012). Es interesante mencionar que el perfil genético de las células mieloides embrionarias es similar a subpoblaciones de macrófagos que expresan Tie2 y se asocian a la vasculatura tumoral (Pucci, Venneri et al. 2009). Teniendo en cuenta estos trabajos, sería interesante determinar en las quimeras que hemos generado si la población de las células derivadas de hígado fetal peri-vasculares asociadas a los grandes vasos (mayoritariamente CD45+) incluye alguna de estas poblaciones hemato-vasculares pro-angiogénicas específicas.

Las propiedades angiogénicas de las células endoteliales de origen fetal también son diferentes a las de endoteliales adultas. Así, células progenitoras endoteliales (CEPs) de hígado fetal obtenidas in vitro de fetos E15-E21 presentan alta eficiencia angiogénica en placas de matrigel comparado con las CPE derivadas de médula ósea (Cherqui, Kurian et al. 2006). Además, CEPs humanas derivadas del cordón umbilical (ECFC) tienen mayor potencial proliferativo in vitro y una respuesta más fuerte a factores angiogénicos que células homólogas derivadas de médula ósea o sangre periférica (Bompais, Chagraoui et al. 2004; Ingram, Mead et al. 2004). Por tanto estos experimentos sugieren que características intrínsecas de progenitores fetales hematopoyéticos y endoteliales, como el incrementado potencial de proliferación, expresión diferencial de marcadores y potencial de generación de poblaciones específicas podrían influir en la mayor contribución vascular dispersa sobre las células adultas.

Como demostramos en el siguiente apartado la contribución de células de hígado fetal a parches endoteliales sinusoidales hepáticos está relacionado con una población no hematopoyética. Posiblemente esta población no existe en la médula ósea adulta y por

tanto no se podría comparar potenciales vasculares de células homólogas. Sin embargo, poblaciones celulares de adulto con capacidad de repoblar la microvasculatura sinusoidal hepática en trasplantes se han descrito anteriormente. Así el grupo de Gupta y colaboradores muestra como poblaciones de células sinusoidales hepáticas de hígado adulto generan parches estables de células endoteliales de microvasculatura sinusoidal cuando son trasplantadas en ratones adultos, similar a los observados por nosotros. En este trabajo trasplanta 2×10^6 células endoteliales sinusoidales (10% de la población total endotelial sinusoidal en el hígado de ratón adulto). A los tres meses post trasplante alcanzan un 9% de repoblación endotelial. (Benten, Kumaran et al. 2005; Follenzi, Benten et al. 2008). En nuestros experimentos, transferimos 10^6 células totales de hígado fetal, de las cuales 2×10^4 son potencialmente precursores endoteliales sinusoidales (PLAP+VE-Cad+CD45-), obteniendo una contribución vascular endotelial del 0.122% del área endotelial (asumiendo que el área del endotelio representa el 1% y la del parénquima hepático el 99%). Proporcionalmente, la frecuencia esperada de repoblación de área vascular si trasplantásemos 2×10^6 células fetales, sería de un 12%, lo cual representa un ligero incremento sobre el 9%. Estos datos apoyarían la idea de que las células fetales presentan un potencial de contribución endotelial ligeramente incrementado sobre las células sinusoidales del hígado adulto. Habría que realizar más experimentos en condiciones de trasplante y cuantificación de injerto equivalentes para determinar este punto ya que en los experimentos de Follenzi y colaboradores trasplantan directamente en la vena portal, en ratones condicionados con MCT (monocrotalina, alcaloide que rompe la barrera endotelial sinusoidal) y analizan repoblación por citometría de flujo (Follenzi, Benten et al. 2008).

Las células del hígado fetal pueden también contribuir a diferentes tipos de células en corazón y riñón. La contribución en corazón parece ser exclusivamente a endotelio sinusoidal, sin embargo no se observa en todas las quimeras. Esto puede estar relacionado con la vía de transferencia celular en la circulación o que el corazón ofrece un entorno menos angiogénico y por tanto más refractario a integrar células externas. Por otra parte, la presencia de células donantes en riñón es una constante en todas las quimeras analizadas. El riñón no solo presenta células endoteliales SCL3'Enh+CD45-IsoB4+, sino también una parte importante de células intersticiales negativas para marcadores endoteliales y hematopoyéticos. Previamente, durante la caracterización de los ratones transgénicos para SCL3'EnhlacZ, nuestro grupo había sugerido que la presencia de células residentes SCL3'Enh+ en el riñón que carecen de marcadores hemato-vasculares podían ser progenitores angioblásticos/ hemangioblásticos locales (Dekel, Hochman et al. 2004).

Usando ensayos de trasplante de médula ósea se demostró que esta población podía derivar de la médula ósea (Dekel, Metsuyanin et al. 2008). Aquí, los experimentos de inmunofluorescencia y caracterización celular en riñón, muestran que progenitores derivados de hígado fetal son también capaces de generar células SCL3'Enh+CD45-IsoB4- CD34^{brillante+}, carentes de marcadores de músculo liso α -SMA y de linaje mieloide F4/80, características acordes con la naturaleza de un progenitor hemato-vascular. Para determinar la naturaleza hematopoyética realizamos ensayos de diferenciación in vitro e in vivo con células PLAP+ del riñón. Aunque el número de experimentos funcionales realizados es muy limitado, parecen sugerir ausencia de actividad progenitora hematopoyética. Ensayos in Vitro serían necesarios para determinar si la naturaleza de estas células es vascular o mesenquimal.

En general, podemos concluir que las células de hígado fetal en el modelo de trasplante en recién nacido pueden contribuir a: endotelio sinusoidal hepático y cardíaco; células hematopoyéticas peri-vasculares y endotelio de vasos portales; células endoteliales, hematopoyéticas e intersticiales en el riñón. Las células de médula ósea contribuyen a poblaciones similares, excepto a la red de endotelios sinusoidales. En el siguiente apartado discutiremos que poblaciones del hígado fetal son responsables de la contribución vascular.

Progenitores hematopoyéticos versus progenitores endoteliales

Previamente nuestro grupo demostró que la población celular que expresaba los elementos reguladores del gen SCL, el vector SCL3'EnhPLAP/LacZ, contenían toda la actividad de células madre y parte de los progenitores hematopoyéticos, tanto en médula ósea como en el hígado fetal. Aquí mostramos que la población SCL3'EnhPLAP^{brillante+} expresa marcadores clásicamente asociados a endotelio (CD31, CD34, Flk1, Tie-2 y VE-Cad) y contiene toda la actividad vascular en trasplantes y también en co-cultivos con la línea OP9. Además, tinciones del hígado fetal con PLAP y análisis por confocal ponen de manifiesto que todo (o gran mayoría) del endotelio vascular CD31+ co-expresa PLAP. Por citometría de flujo, marcadores endoteliales también se observan en una pequeña fracción de las células PLAP-, sin embargo, los ensayos de co-cultivos con OP9, incluso empleando 10 veces mas células, indican ausencia de actividad vascular. En general consideramos que, teniendo en cuenta criterios fenotípicos, funcionales y morfológicos, la población PLAP+ engloba todas las células con potencial endotelial. En el futuro habría que realizar ensayos de cultivo específicos de endotelio maduro sobre matriz de colágeno o fibrinógeno (Marin, Kaplanski

et al. 2001; Cherqui, Kurian et al. 2006) para determinar que tipos de poblaciones endoteliales engloba la población que expresa el vector SCL3'Enh.

El trasplante de las células PLAP+ resulta en la repoblación hematopoyética, contribución peri-vascular portal y repoblación del endotelio sinusoidal hepático. El empleo del marcador VE-Cadherina, marcador clásico de células endoteliales (Carmeliet, Lampugnani et al. 1999), esta fundamentado en trabajos previos que muestran la existencia de un precursor hemangioblástico VE-Cad+Flk1+CD45- en el saco vitelino (Nishikawa, Nishikawa et al. 1998) y en CMHs de hígado fetal (Taoudi, Morrison et al. 2005; Kim, Saunders et al. 2007). Por lo tanto, razonamos que VE-Cad podría marcar una población bi-potencial hemato-vascular. Los resultandos muestran que el marcador VE-Cad permite separar la población con actividad de repoblación del endotelio sinusoidal hepático pero no permite separar de la repoblación hematopoyética y peri-vascular. Así mismo, el empleo del marcador CD45 establece que la actividad de repoblación del endotelio sinusoidal hepático solo se detecta en la población PLAP+CD45-. Estos datos refuerzan la idea de que la población PLAP+VE-Cad+CD45- es la responsable de la repoblación endotelial sinusoidal. De hecho hemos obtenido un animal trasplantado con esta fracción seleccionada que presenta repoblación endotelial pero no hematopoyética ni contribución peri-vascular y endotelial portal. Por lo tanto, indican que jerarquía hematopoyética y vascular sinusoidal están separadas en el hígado fetal de estadio E12. Apoyando esta idea están los datos que muestran que los 3 animales trasplantadas con células CD45- solo presentan contribución endotelial sinusoidal mientras que la gran mayoría de los animales con contribución hematopoyética presentan células peri-portales. Por tanto estos datos sugieren que la actividad CMH y contribución peri-vascular y endotelial portal van ligadas a población con actividad hematopoyética (PLAP+VE-Cad+/- y PLAP+CD45+) y la actividad repoblación sinusoidal va ligada a población que no presenta actividad CMH (PLAP+CD45- y PLAP+VE-Cad+CD45-). Esta población pudiera ser el homólogo de las células sinusoidales de hígado adulto, cuyo fenotipo se ha descrito recientemente como VEGFR3+CD34-VEGFR2+VE-Cadherina+FactorVIII+CD45- (Ding, Nolan et al. 2010). Las células fetales endoteliales sinusoidales se distinguen por la expresión de CD34, como muestran nuestros datos y la de otros grupos (Nonaka, Tanaka et al. 2007).

El análisis de la contribución vascular del riñón, muestra la aparición de parches vasculares en animales trasplantados con células CD45+, ninguno de los cuales presenta contribución sinusoidal hepática. Esto sugeriría que la contribución en riñón se debe mayoritariamente a células progenitoras/efectoras hematopoyéticas. Apoyando esta idea, esta el hecho de que la quimera trasplantada con células CD45- y VE-Cad+CD45-, tampoco presentan señal en el

riñón. Estos datos por tanto, indican que la contribución en riñón, se debe a una población diferente a la que contribuye a la microvasculatura endotelial hepática.

Emergencia de progenitores endoteliales trasplantables durante la embriogénesis: relación con localizaciones hematopoyéticas, hemangioblastos, endotelio hemogénico, meso-angioblastos y angioblastos.

El potencial de repoblación de microvasculatura sinusoidal en otras localizaciones hematopoyéticas en embriones de estadio E12 muestra que solo células del AGM y del hígado fetal presentan esta actividad. El AGM es una zona donde se generan los primeros esbozos del sistema urogenital. Se han descrito distintos tipos de precursores entre los que se encuentran las CMHs, CPHs, células mesénquimales (Dzierzak 2005), endotelio hemogénico (Zovein, Hofmann et al. 2008; Boisset, van Cappellen et al. 2010) y células meso-angioblástica (Minasi, Riminucci et al. 2002). Considerando que las CMHs del hígado fetal, del saco vitelino y de la placenta no generan parches de vasculatura sinusoidal, asumimos que las CMHs del AGM tampoco generarían parches vasculares. De hecho se ha descrito en el AGM la población VE-Cad+CD45+ con potencial pre-CMH (Taoudi, Gonneau et al. 2008). Pero estas células expresan CD41, y no tiene capacidad de formación de colonias endoteliales. Respecto al endotelio hemogénico no podemos completamente descartar que este endotelio especial sea el responsable de la generación de vasculatura sinusoidal hepática. De hecho creemos que en el hígado no se ha indagado en detalle su existencia. Pero es un punto difícil de demostrar, ya que a día de hoy no se han obtenido marcadores específicos que lo identifiquen. Las células mesenquimales aparecen en el AGM a día 11 -12. Algunos trabajos indican que estas células pueden generar células endoteliales en trasplantes (Ver Introducción), pero no endotelio sinusoidal. En el hígado sin embargo no se detectan hasta el día 16-17 (Dzierzak 2005), descartando esta población como origen del endotelio sinusoidal endotelial hepático derivado del hígado o del AGM. Otro tipo de precursor descrito en el AGM y relacionado con el linaje vascular son los precursores meso-angioblásticos, un progenitor común para células vasculares y extravasculares (musculo) que esta asociado a la aorta dorsal y expresa Flk1, CD34 , VE-Cad and α SMA. En trasplantes se incorporan al endotelio vascular. En nuestro conocimiento, no se ha descrito que tengan potencial vascular sinusoidal. Experimentos de fraccionamiento celular y trasplante serían

necesarios para determinar su actividad endotelial sinusoidal. Por tanto existirían en el AGM diversas poblaciones potencialmente responsables de la contribución endotelial sinusoidal. Experimentos de fraccionamiento celular y trasplante podrían determinar si alguna de estas poblaciones presenta esta actividad.

El análisis de la aparición de la actividad vascular en otras localizaciones embrionarias muestra de nuevo que la actividad hematopoyética, peri-vascular y endotelial portal y contribución a parches en riñones van asociada, como sucedía con las células CD45+ de hígado fetal.

La idea que emerge es que el TEPC es un precursor sinusoidal del hígado fetal. El origen concreto de la vascular hepática es un tema aún en discusión. Las primeras células Flk1+ aparecen temprano. El primordio del hígado es invadido por ramas vasculares de la vena cardinal, que recibe sangre del cuerpo del embrión, y por la vena onfalomesentérica o vitelina, que lleva sangre del saco vitelino al seno venoso. Las células sinusoidales tienen un origen aun discutido. Según algunos autores derivan del endocardio (Perez-Pomares, Carmona et al. 2004). Otros sugieren que su origen es el mesénquima del septo transversal al igual que las células estrelladas (Si-Tayeb, Lemaigre et al. 2010). Otros proponen origen de ramificaciones endoteliales de vasos de mayor calibre (Shiojiri, Niwa et al. 2006). Entre día 10 y 11 se expanden las células sinusoidales, pero solo a día 12 se observa una completa red sinusoidal y se perfila la estructura de arterias y venas. Las células sinusoidales expresan altos niveles de Flk1 y otros marcadores como Lyve1. Lyve 1 también se encuentra en el AGM. Esto indicaría cierta inmadurez. La capacidad de ser trasplantadas probablemente esta asociada al incremento de Flk1 y capacidad de responder a VEGFR.

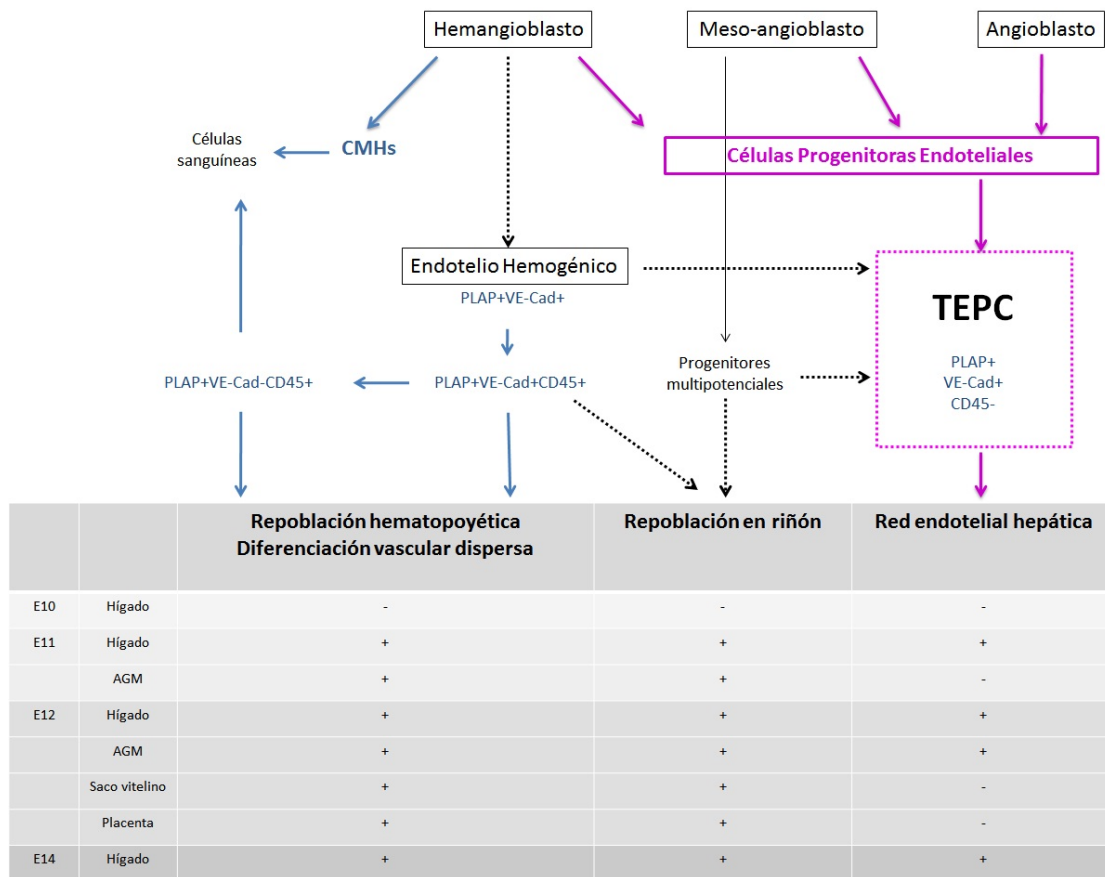


FIGURA 57. ¿Dónde y cuándo aparecen las diferentes poblaciones descritas?

La población PLAP+ engloba las células con potencial endotelial en el embrión. Con el empleo de VE-Cad y CD45 hemos podido separar en hígado fetal de día 12 una población hemato-vascular con potencial de repoblar hematopoyésis y espacios vasculares, de otra capaz de formar una red endotelial sinusoidal (TEPC) en hígado. El potencial hemato-vascular se observa en trasplantes con todas las localizaciones hematopoyéticas a partir de día 11, consideramos que el origen de tal potencial proviene de progenitores hemangioblásticos o del endotelio hemogénico que expresan SCL3'Enh PLAP y CD45, independientemente de la expresión de VE-Cad. La actividad TEPC, aunque sea un progenitor CD45- no podemos descartar un origen en el endotelio hemogénico VE-Cad+ que no alcance el potencial hematopoyético. También puede tener un origen en progenitores mesenquimales pluripotenciales denominados mesoangioblastos en el AGM o bien derivar de un origen angioblástico que genere progenitores endoteliales sinusoidales hepáticos. La señal en riñón puede estar relacionado con progenitores multipotenciales mesenquimales o hematopoyéticos CD45+.

Dinámica de re-población vascular del hígado neonatal.

Los datos indican por tanto que las células de hígado fetal de estadio E12 incluye una población capaz de repoblar de forma estable la microvasculatura sinusoidal hepática cuando se trasplantan a recién nacidos tratados con busulfan o adultos irradiados. Esto ofrece la posibilidad de emplear estos progenitores sinusoidales en procesos de reparación o manipulación endotelial, como previamente se ha mostrado en otros trabajos donde se muestra la recuperación de mutantes hemofílicos, carentes del factor VII, mediante

trasplantes de células sinusoidales de adulto (Follenzi, Benten et al. 2008). También el trasplante de células sinusoidales se ha empleado en procesos de regeneración hepática (Ding, Nolan et al. 2010) donde se demuestra su función angiocrina mediante modulación de producción de factor de crecimiento de hepatocitos modulados por factores de transcripción *id1* y *wnt*. Sería de alto interés determinar si las células de origen fetal presentan un potencial diferencial y/ o superior en estos procesos. Para hacer este tipo de experimentos es fundamental conocer la dinámica de integración (expansión del injerto, condicionamiento del receptor, importancia de la purificación celular, etc). Nosotros mostramos como las células del donante se observan a partir de las dos semanas y como el número de parches vasculares va incrementándose hasta llegar a un límite a las 5-6 semanas post trasplante. Esto sugeriría que las células donantes siguen un proceso similar de proliferación a las endógenas, acompañando a la pauta de crecimiento posnatal normal. Para determinar este punto sería necesario emplear marcadores de proliferación y ver si hay diferencias entre las endógenas y trasplantadas.

Morfológicamente, no se aprecia ninguna diferencia entre la estructura sinusoidal-hepática en las zonas con células donantes y las células endógenas, indicando una integración aparentemente normal. Recientemente trabajos de cuantificación de interacción sinusoide/hepatocitos sobre imágenes de alta resolución muestran el papel fundamental que tienen las células endoteliales en la orientación del eje de división de hepatocitos en procesos de regeneración (Hoehme, Brulport et al. 2010). Sería altamente interesante determinar si en nuestras quimeras el radio de interacción se mantiene y por tanto puede emplearse como base de estudio en modificaciones genética del endotelio en estudios de organogénesis neonatal.

Otro punto importante, es que la repoblación vascular sinusoidal no necesita el pre-condicionamiento del receptor con busulfán, un agente mieloablativo ampliamente empleado en trasplantes de médula ósea para injertos hematopoyético y que también afecta a las células endoteliales (Vassord, Lapoumeroulie et al. 2008; Zeng, Jia et al. 2010). Esto indicaría que el estatus de angiogénesis activa de recién nacido es suficiente para permitir la integración de las células endoteliales sinusoidales donantes, que posteriormente se expanden y forman un parche vascular. Ciertamente la frecuencia y extensión de los parches es menor que en los tratados con busulfán, indicando que el tratamiento proporciona cierta ventaja proliferativa a las células donantes. Sería interesante establecer si cada parche procede de un solo progenitor mediante experimentos de marcaje Cre/lox, y establecer así la extensión de proliferación al que una célula en concreto puede exponerse.

CONCLUSIONES

Usando el elemento regulador SCL3'Enh-PLAP como marcador de linaje vascular, de progenitores y células madre en experimentos de trasplante y análisis a corto y largo plazo, concluimos que:

1. Células de hígado fetal de día 12 presentan un potencial de injerto vascular mayor que células de médula ósea adulto cuando son trasplantadas en receptores recién nacidos tratados con busulfán o en receptores adultos irradiados.
2. Células donantes de hígado fetal y de médula ósea pueden integrarse como células peri-vasculares o vasculares en los vasos de área peri-portal del hígado, adquiriendo una naturaleza hematopoyética o endotelial.
3. Células de hígado fetal de día 12 tienen potencial de generar estructuras de parches de microvasculatura o endotelio sinusoidal en el hígado y corazón. En el riñón los parches están compuestos por una mezcla de células endoteliales, progenitores y /o células intersticiales.
4. Las células de médula ósea no generan parches de aspecto vascular en hígado, riñón ni corazón, se integran de forma esporádica como células hematopoyéticas y endoteliales.
5. Existe variabilidad en el grado de contribución de célula fetal donante según el órgano que se analice, limitado a unas pocas células endoteliales en el corazón y alto injerto endotelial en el hígado y en el riñón.
6. El sistema de trasplante en recién nacidos tratados con busulfan permite la integración esporádica de hepatocitos derivados del donante, pero no la repoblación hepática.
7. La actividad de repoblación vascular y hematopoyética se localiza en la población de células de hígado fetal SCL3'EnhPLAP^{brillante}, mientras que la población PLAP- no presenta ninguna de estas actividades.
8. El potencial de repoblación vascular hepática en forma de parche solo se detecta en la población de hígado fetal SCL3'EnhPLAP^{brillante}VE-Cad+CD45-, denominada Célula

Progenitora Endotelial Trasplantable (TEPC). No contiene CMHs con capacidad de repoblar. No contiene actividad peri-vascular y endotelial de zonas portales.

9. En las poblaciones de hígado fetal SCL3'EnhPLAP^{brillante}VE-Cad+CD45+ y PLAP^{brillante}VE-Cad-CD45+ se localiza la actividad de repoblación hemato-vascular asociada a señal dispersa peri-vascular y endotelial de zonas portales que a su vez está correlacionada con la presencia de progenitores hematopoyéticos, CMHs y CPHs.
10. La población TEPC de hígado fetal E12 es responsable de generar parches de microvasculatura sinusoidal endotelial solo en hígado.
11. La generación de parches en riñón y corazón está asociado al trasplante de células hematopoyéticas de hígado fetal (PLAP^{brillante}VE-Cad+CD45+/VE-Cad-CD45+).
12. Existe una correlación entre la presencia de células PLAP^{brillante}VE-Cad+CD45+, la actividad de CMH y el potencial de contribución a la vasculatura dispersa en todas las regiones embrionarias hematopoyéticas analizadas.
13. Precursores TEPC capaces de generar parches vasculares en hígado se encuentran también en la región de AGM E12, pero a una frecuencia inferior que en el hígado fetal del mismo estadio.
14. La actividad TEPC en el hígado fetal se detecta a día 11 de desarrollo, con un nivel de repoblación vascular similar al detectado con embriones de día 12. Esta actividad está también presente en embriones de día 14.
15. La región del AGM E11 no presenta actividad TEPC, pero tiene potencial de integrarse en el riñón y en el corazón formando parches vasculares.
16. Después del cultivo de AGM E11 en un sistema de explantes, adquiere potencial para generar parches vasculares en hígado acompañado de un incremento en el porcentaje de células PLAP^{brillante}, constituyendo un potencial sistema para la generación y/o expansión de TEPC.

17. El sistema de explantes no parece adecuado para generación y/o expansión de TEPC con células de hígado fetal E11, pues producen una drástica reducción respecto a la capacidad de formación de parches de células sin cultivar.
18. Las células PLAP^{brillante}VE-Cad+ formadoras de parche se comportan en ensayos de diferenciación endotelial in vitro como otros precursores que no poseen actividad TEPC tales como los de AGM E11.
19. Los parches vasculares derivado de hígado fetal de día 12 aparecen en secciones de hígado a partir de las 3 semanas post trasplante a una frecuencia muy baja. La frecuencia de número y área de parches se estabiliza a partir de las 4-6 semanas y se mantiene durante la vida adulta.
20. No es necesario el condicionamiento cito-tóxico previo del receptor con busulfán para obtener repoblación vascular en diferentes órganos con células de hígado fetal. Sin embargo, la frecuencia de repoblación vascular disminuye. Este condicionamiento es necesario para la repoblación hematopoyética.

BIBLIOGRAFÍA

- Adamo, L. and G. Garcia-Cardena (2012). "The vascular origin of hematopoietic cells." Dev Biol **362**(1): 1-10.
- Alvarez-Dolado, M., R. Pardo, et al. (2003). "Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes." Nature **425**(6961): 968-973.
- Armulik, A., G. Genove, et al. (2011). "Pericytes: developmental, physiological, and pathological perspectives, problems, and promises." Dev Cell **21**(2): 193-215.
- Asahara, T., T. Murohara, et al. (1997). "Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis." Science **275**(5302): 964-967.
- Bailey, A. S., S. Jiang, et al. (2004). "Transplanted adult hematopoietic stem cells differentiate into functional endothelial cells." Blood **103**(1): 13-19.
- Bailey, A. S., H. Willenbring, et al. (2006). "Myeloid lineage progenitors give rise to vascular endothelium." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(35): 13156-13161.
- Begley, C. G. and A. R. Green (1999). "The SCL gene: from case report to critical hematopoietic regulator." Blood **93**(9): 2760-2770.
- Begley, C. G., L. Robb, et al. (1994). "Structure of the gene encoding the murine SCL protein." Gene **138**(1-2): 93-99.
- Benten, D., V. Kumaran, et al. (2005). "Hepatocyte transplantation activates hepatic stellate cells with beneficial modulation of cell engraftment in the rat." Hepatology **42**(5): 1072-1081.
- Bertolini, F., Y. Shaked, et al. (2006). "The multifaceted circulating endothelial cell in cancer: towards marker and target identification." Nat Rev Cancer **6**(11): 835-845.
- Bertrand, J. Y., N. C. Chi, et al. (2010). "Haematopoietic stem cells derive directly from aortic endothelium during development." Nature **464**(7285): 108-111.
- Bishop, C. E., P. Boursot, et al. (1985). "Most classical Mus musculus domesticus laboratory mouse strains carry a Mus musculus musculus Y chromosome." Nature **315**(6014): 70-72.
- Bloor, A. J., M. J. Sanchez, et al. (2002). "The role of the stem cell leukemia (SCL) gene in hematopoietic and endothelial lineage specification." J Hematother Stem Cell Res **11**(2): 195-206.
- Bockamp, E., C. Antunes, et al. (2009). "In vivo fate mapping with SCL regulatory elements identifies progenitors for primitive and definitive hematopoiesis in mice." Mech Dev **126**(10): 863-872.
- Boisset, J. C., W. van Cappellen, et al. (2010). "In vivo imaging of haematopoietic cells emerging from the mouse aortic endothelium." Nature **464**(7285): 116-120.

- Bompais, H., J. Chagraoui, et al. (2004). "Human endothelial cells derived from circulating progenitors display specific functional properties compared with mature vessel wall endothelial cells." Blood **103**(7): 2577-2584.
- Bowie, M. B., D. G. Kent, et al. (2007). "Steel factor responsiveness regulates the high self-renewal phenotype of fetal hematopoietic stem cells." Blood **109**(11): 5043-5048.
- Bowie, M. B., D. G. Kent, et al. (2007). "Identification of a new intrinsically timed developmental checkpoint that reprograms key hematopoietic stem cell properties." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(14): 5878-5882.
- Carmeliet, P. (2000). "Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis." Nat Med **6**(4): 389-395.
- Carmeliet, P. (2003). "Angiogenesis in health and disease." Nat Med **9**(6): 653-660.
- Carmeliet, P., M. G. Lampugnani, et al. (1999). "Targeted deficiency or cytosolic truncation of the VE-cadherin gene in mice impairs VEGF-mediated endothelial survival and angiogenesis." Cell **98**(2): 147-157.
- Claxton, S. and M. Fruttiger (2005). "Oxygen modifies artery differentiation and network morphogenesis in the retinal vasculature." Dev Dyn **233**(3): 822-828.
- Critser, P. J. and M. C. Yoder (2010). "Endothelial colony-forming cell role in neoangiogenesis and tissue repair." Curr Opin Organ Transplant **15**(1): 68-72.
- Crivellato, E., B. Nico, et al. (2007). "Contribution of endothelial cells to organogenesis: a modern reappraisal of an old Aristotelian concept." J Anat **211**(4): 415-427.
- Cumano, A., J. C. Ferraz, et al. (2001). "Intraembryonic, but not yolk sac hematopoietic precursors, isolated before circulation, provide long-term multilineage reconstitution." Immunity **15**(3): 477-485.
- Chao, H. and K. K. Hirschi (2010). "Hemato-vascular origins of endothelial progenitor cells?" Microvasc Res **79**(3): 169-173.
- Chavakis, E., A. Aicher, et al. (2005). "Role of beta2-integrins for homing and neovascularization capacity of endothelial progenitor cells." J Exp Med **201**(1): 63-72.
- Cherqui, S., S. M. Kurian, et al. (2006). "Isolation and angiogenesis by endothelial progenitors in the fetal liver." Stem Cells **24**(1): 44-54.
- D'Souza, S. L., A. G. Elefanty, et al. (2005). "SCL/Tal-1 is essential for hematopoietic commitment of the hemangioblast but not for its development." Blood **105**(10): 3862-3870.

- Dabeva, M. D., P. M. Petkov, et al. (2000). "Proliferation and differentiation of fetal liver epithelial progenitor cells after transplantation into adult rat liver." Am J Pathol **156**(6): 2017-2031.
- Davidson, A. J. (2008). Mouse kidney development. StemBook. Cambridge (MA).
- de Bruijn, M. F., X. Ma, et al. (2002). "Hematopoietic stem cells localize to the endothelial cell layer in the midgestation mouse aorta." Immunity **16**(5): 673-683.
- de Bruijn, M. F., M. C. Peeters, et al. (2000). "CFU-S(11) activity does not localize solely with the aorta in the aorta-gonad-mesonephros region." Blood **96**(8): 2902-2904.
- De Palma, M., M. A. Venneri, et al. (2005). "Tie2 identifies a hematopoietic lineage of proangiogenic monocytes required for tumor vessel formation and a mesenchymal population of pericyte progenitors." Cancer Cell **8**(3): 211-226.
- Dekel, B., E. Hochman, et al. (2004). "Kidney, blood, and endothelium: developmental expression of stem cell leukemia during nephrogenesis." Kidney Int **65**(4): 1162-1169.
- Dekel, B., S. Metsuyanin, et al. (2008). "Organ-injury-induced reactivation of hemangioblastic precursor cells." Leukemia **22**(1): 103-113.
- Deleuze, V., E. Chalhoub, et al. (2007). "TAL-1/SCL and its partners E47 and LMO2 up-regulate VE-cadherin expression in endothelial cells." Mol Cell Biol **27**(7): 2687-2697.
- Dieterlen-Lievre, F. and T. Jaffredo (2009). "Decoding the hemogenic endothelium in mammals." Cell Stem Cell **4**(3): 189-190.
- Dieterlen-Lievre, F., C. Pouget, et al. (2006). "Are intra-aortic hemopoietic cells derived from endothelial cells during ontogeny?" Trends Cardiovasc Med **16**(4): 128-139.
- Ding, B. S., D. J. Nolan, et al. (2010). "Inductive angiocrine signals from sinusoidal endothelium are required for liver regeneration." Nature **468**(7321): 310-315.
- Dzierzak, E. (2005). "The emergence of definitive hematopoietic stem cells in the mammal." Curr Opin Hematol **12**(3): 197-202.
- Eichmann, A., L. Yuan, et al. (2005). "Vascular development: from precursor cells to branched arterial and venous networks." Int J Dev Biol **49**(2-3): 259-267.
- Eilken, H. M., S. Nishikawa, et al. (2009). "Continuous single-cell imaging of blood generation from haemogenic endothelium." Nature **457**(7231): 896-900.
- Fantin, A., J. M. Vieira, et al. (2010). "Tissue macrophages act as cellular chaperones for vascular anastomosis downstream of VEGF-mediated endothelial tip cell induction." Blood **116**(5): 829-840.

- Fehling, H. J., G. Lacaud, et al. (2003). "Tracking mesoderm induction and its specification to the hemangioblast during embryonic stem cell differentiation." Development **130**(17): 4217-4227.
- Follenzi, A., D. Benten, et al. (2008). "Transplanted endothelial cells repopulate the liver endothelium and correct the phenotype of hemophilia A mice." J Clin Invest **118**(3): 935-945.
- Fraser, C. C., C. J. Eaves, et al. (1990). "Expansion in vitro of retrovirally marked totipotent hematopoietic stem cells." Blood **76**(6): 1071-1076.
- Fraser, S. T., M. Ogawa, et al. (2003). "Putative intermediate precursor between hematogenic endothelial cells and blood cells in the developing embryo." Dev Growth Differ **45**(1): 63-75.
- Garcia-Barros, M., F. Paris, et al. (2003). "Tumor response to radiotherapy regulated by endothelial cell apoptosis." Science **300**(5622): 1155-1159.
- Gekas, C., F. Dieterlen-Lievre, et al. (2005). "The placenta is a niche for hematopoietic stem cells." Dev Cell **8**(3): 365-375.
- Gerhardt, H., M. Golding, et al. (2003). "VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia." J Cell Biol **161**(6): 1163-1177.
- Gering, M., A. R. Rodaway, et al. (1998). "The SCL gene specifies haemangioblast development from early mesoderm." EMBO J **17**(14): 4029-4045.
- Geudens, I. and H. Gerhardt (2011). "Coordinating cell behaviour during blood vessel formation." Development **138**(21): 4569-4583.
- Gottgens, B., L. M. Barton, et al. (2000). "Analysis of vertebrate SCL loci identifies conserved enhancers." Nat Biotechnol **18**(2): 181-186.
- Gottgens, B., F. McLaughlin, et al. (1997). "Transcription of the SCL gene in erythroid and CD34 positive primitive myeloid cells is controlled by a complex network of lineage-restricted chromatin-dependent and chromatin-independent regulatory elements." Oncogene **15**(20): 2419-2428.
- Gottgens, B., A. Nastos, et al. (2002). "Establishing the transcriptional programme for blood: the SCL stem cell enhancer is regulated by a multiprotein complex containing Ets and GATA factors." EMBO J **21**(12): 3039-3050.
- Grant, M. B., W. S. May, et al. (2002). "Adult hematopoietic stem cells provide functional hemangioblast activity during retinal neovascularization." Nat Med **8**(6): 607-612.
- Grunewald, M., I. Avraham, et al. (2006). "VEGF-induced adult neovascularization: recruitment, retention, and role of accessory cells." Cell **124**(1): 175-189.

- Hall, M. A., N. J. Slater, et al. (2005). "Functional but abnormal adult erythropoiesis in the absence of the stem cell leukemia gene." Mol Cell Biol **25**(15): 6355-6362.
- Harashima, A., M. Suzuki, et al. (2002). "CD45 tyrosine phosphatase inhibits erythroid differentiation of umbilical cord blood CD34+ cells associated with selective inactivation of Lyn." Blood **100**(13): 4440-4445.
- Hardy, R. R. and K. Hayakawa (1991). "A developmental switch in B lymphopoiesis." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(24): 11550-11554.
- Harrison, D. E., R. K. Zhong, et al. (1997). "Relative to adult marrow, fetal liver repopulates nearly five times more effectively long-term than short-term." Exp Hematol **25**(4): 293-297.
- He, S., I. Kim, et al. (2011). "Sox17 expression confers self-renewal potential and fetal stem cell characteristics upon adult hematopoietic progenitors." Genes Dev **25**(15): 1613-1627.
- Hicks, D. J., L. Johnson, et al. (2006). "Evaluation of zinc salt based fixatives for preserving antigenic determinants for immunohistochemical demonstration of murine immune system cell markers." Biotech Histochem **81**(1): 23-30.
- Hirashima, M., H. Kataoka, et al. (1999). "Maturation of embryonic stem cells into endothelial cells in an in vitro model of vasculogenesis." Blood **93**(4): 1253-1263.
- Hoehme, S., M. Brulport, et al. (2010). "Prediction and validation of cell alignment along microvessels as order principle to restore tissue architecture in liver regeneration." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(23): 10371-10376.
- Holmes, R. and J. C. Zuniga-Pflucker (2009). "The OP9-DL1 system: generation of T-lymphocytes from embryonic or hematopoietic stem cells in vitro." Cold Spring Harb Protoc **2009**(2): pdb prot5156.
- Huber, T. L., V. Kouskoff, et al. (2004). "Haemangioblast commitment is initiated in the primitive streak of the mouse embryo." Nature **432**(7017): 625-630.
- Hur, J., H. M. Yang, et al. (2007). "Identification of a novel role of T cells in postnatal vasculogenesis: characterization of endothelial progenitor cell colonies." Circulation **116**(15): 1671-1682.
- Ikuta, K., T. Kina, et al. (1990). "A developmental switch in thymic lymphocyte maturation potential occurs at the level of hematopoietic stem cells." Cell **62**(5): 863-874.
- Ingram, D. A., N. M. Caplice, et al. (2005). "Unresolved questions, changing definitions, and novel paradigms for defining endothelial progenitor cells." Blood **106**(5): 1525-1531.

- Ingram, D. A., L. E. Mead, et al. (2004). "Identification of a novel hierarchy of endothelial progenitor cells using human peripheral and umbilical cord blood." Blood **104**(9): 2752-2760.
- Ivanova, N. B., J. T. Dimos, et al. (2002). "A stem cell molecular signature." Science **298**(5593): 601-604.
- Jaffredo, T., R. Gautier, et al. (1998). "Intraaortic hemopoietic cells are derived from endothelial cells during ontogeny." Development **125**(22): 4575-4583.
- Jaffredo, T., C. Richard, et al. (2010). "Aortic remodelling during hemogenesis: is the chicken paradigm unique?" Int J Dev Biol **54**(6-7): 1045-1054.
- Jiang, S., L. Walker, et al. (2004). "Transplanted human bone marrow contributes to vascular endothelium." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(48): 16891-16896.
- Kennedy, M., M. Firpo, et al. (1997). "A common precursor for primitive erythropoiesis and definitive haematopoiesis." Nature **386**(6624): 488-493.
- Kiel, M. J., O. H. Yilmaz, et al. (2005). "SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells." Cell **121**(7): 1109-1121.
- Kikuchi, K. and M. Kondo (2006). "Developmental switch of mouse hematopoietic stem cells from fetal to adult type occurs in bone marrow after birth." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(47): 17852-17857.
- Kim, I., T. L. Saunders, et al. (2007). "Sox17 dependence distinguishes the transcriptional regulation of fetal from adult hematopoietic stem cells." Cell **130**(3): 470-483.
- Kim, S. J., J. S. Kim, et al. (2009). "Circulating monocytes expressing CD31: implications for acute and chronic angiogenesis." Am J Pathol **174**(5): 1972-1980.
- Klimchenko, O., A. Di Stefano, et al. (2011). "Monocytic cells derived from human embryonic stem cells and fetal liver share common differentiation pathways and homeostatic functions." Blood **117**(11): 3065-3075.
- Kodama, H., M. Nose, et al. (1992). "In vitro proliferation of primitive hemopoietic stem cells supported by stromal cells: evidence for the presence of a mechanism(s) other than that involving c-kit receptor and its ligand." J Exp Med **176**(2): 351-361.
- Kumaravelu, P., L. Hook, et al. (2002). "Quantitative developmental anatomy of definitive haematopoietic stem cells/long-term repopulating units (HSC/RUs): role of the aorta-gonad-mesonephros (AGM) region and the yolk sac in colonisation of the mouse embryonic liver." Development **129**(21): 4891-4899.

- Lammert, E., O. Cleaver, et al. (2003). "Role of endothelial cells in early pancreas and liver development." Mech Dev **120**(1): 59-64.
- Lancrin, C., P. Sroczynska, et al. (2009). "The haemangioblast generates haematopoietic cells through a haemogenic endothelium stage." Nature **457**(7231): 892-895.
- Larrivee, B., K. Niessen, et al. (2005). "Minimal contribution of marrow-derived endothelial precursors to tumor vasculature." J Immunol **175**(5): 2890-2899.
- le Noble, F., D. Moyon, et al. (2004). "Flow regulates arterial-venous differentiation in the chick embryo yolk sac." Development **131**(2): 361-375.
- Lin, G., E. Finger, et al. (1995). "Expression of CD34 in endothelial cells, hematopoietic progenitors and nervous cells in fetal and adult mouse tissues." Eur J Immunol **25**(6): 1508-1516.
- Ling, K. W., K. Ottersbach, et al. (2004). "GATA-2 plays two functionally distinct roles during the ontogeny of hematopoietic stem cells." J Exp Med **200**(7): 871-882.
- Lux, C. T., M. Yoshimoto, et al. (2008). "All primitive and definitive hematopoietic progenitor cells emerging before E10 in the mouse embryo are products of the yolk sac." Blood **111**(7): 3435-3438.
- Lyden, D., K. Hattori, et al. (2001). "Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth." Nat Med **7**(11): 1194-1201.
- MacLaren, R. E., R. A. Pearson, et al. (2006). "Retinal repair by transplantation of photoreceptor precursors." Nature **444**(7116): 203-207.
- Marin, V., G. Kaplanski, et al. (2001). "Endothelial cell culture: protocol to obtain and cultivate human umbilical endothelial cells." J Immunol Methods **254**(1-2): 183-190.
- McKinney-Freeman, S. L., O. Naveiras, et al. (2009). "Surface antigen phenotypes of hematopoietic stem cells from embryos and murine embryonic stem cells." Blood **114**(2): 268-278.
- Medina, R. J., C. L. O'Neill, et al. (2010). "Outgrowth endothelial cells: characterization and their potential for reversing ischemic retinopathy." Invest Ophthalmol Vis Sci **51**(11): 5906-5913.
- Medvinsky, A. and E. Dzierzak (1996). "Definitive hematopoiesis is autonomously initiated by the AGM region." Cell **86**(6): 897-906.
- Medvinsky, A., S. Rybtsov, et al. (2011). "Embryonic origin of the adult hematopoietic system: advances and questions." Development **138**(6): 1017-1031.

- Medvinsky, A. L., N. L. Samoylina, et al. (1993). "An early pre-liver intraembryonic source of CFU-S in the developing mouse." Nature **364**(6432): 64-67.
- Melero-Martin, J. M., M. E. De Obaldia, et al. (2008). "Engineering robust and functional vascular networks in vivo with human adult and cord blood-derived progenitor cells." Circ Res **103**(2): 194-202.
- Mendes, S. C., C. Robin, et al. (2005). "Mesenchymal progenitor cells localize within hematopoietic sites throughout ontogeny." Development **132**(5): 1127-1136.
- Meng, A., Y. Wang, et al. (2003). "Ionizing radiation and busulfan inhibit murine bone marrow cell hematopoietic function via apoptosis-dependent and -independent mechanisms." Exp Hematol **31**(12): 1348-1356.
- Minasi, M. G., M. Riminucci, et al. (2002). "The meso-angioblast: a multipotent, self-renewing cell that originates from the dorsal aorta and differentiates into most mesodermal tissues." Development **129**(11): 2773-2783.
- Moore, M. A. and D. Metcalf (1970). "Ontogeny of the haemopoietic system: yolk sac origin of in vivo and in vitro colony forming cells in the developing mouse embryo." Br J Haematol **18**(3): 279-296.
- Morrison, S. J., H. D. Hemmati, et al. (1995). "The purification and characterization of fetal liver hematopoietic stem cells." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(22): 10302-10306.
- Muller, A. M. and E. A. Dzierzak (1993). "ES cells have only a limited lymphopoietic potential after adoptive transfer into mouse recipients." Development **118**(4): 1343-1351.
- Nierhoff, D., A. Ogawa, et al. (2005). "Purification and characterization of mouse fetal liver epithelial cells with high in vivo repopulation capacity." Hepatology **42**(1): 130-139.
- Nikolova, G., B. Strilic, et al. (2007). "The vascular niche and its basement membrane." Trends Cell Biol **17**(1): 19-25.
- Nishikawa, S. I., S. Nishikawa, et al. (1998). "In vitro generation of lymphohematopoietic cells from endothelial cells purified from murine embryos." Immunity **8**(6): 761-769.
- Nolan, D. J., A. Ciarrocchi, et al. (2007). "Bone marrow-derived endothelial progenitor cells are a major determinant of nascent tumor neovascularization." Genes Dev **21**(12): 1546-1558.
- Nonaka, H., M. Tanaka, et al. (2007). "Development of murine hepatic sinusoidal endothelial cells characterized by the expression of hyaluronan receptors." Dev Dyn **236**(8): 2258-2267.

- North, T. E., M. F. de Bruijn, et al. (2002). "Runx1 expression marks long-term repopulating hematopoietic stem cells in the midgestation mouse embryo." Immunity **16**(5): 661-672.
- Oertel, M., A. Menthena, et al. (2007). "Comparison of hepatic properties and transplantation of Thy-1(+) and Thy-1(-) cells isolated from embryonic day 14 rat fetal liver." Hepatology **46**(4): 1236-1245.
- Oertel, M., A. Menthena, et al. (2006). "Cell competition leads to a high level of normal liver reconstitution by transplanted fetal liver stem/progenitor cells." Gastroenterology **130**(2): 507-520; quiz 590.
- Orlova, V. V., E. Y. Choi, et al. (2007). "A novel pathway of HMGB1-mediated inflammatory cell recruitment that requires Mac-1-integrin." EMBO J **26**(4): 1129-1139.
- Oswald, J., S. Boxberger, et al. (2004). "Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro." Stem Cells **22**(3): 377-384.
- Ottersbach, K. and E. Dzierzak (2005). "The murine placenta contains hematopoietic stem cells within the vascular labyrinth region." Dev Cell **8**(3): 377-387.
- Pardanaud, L., D. Luton, et al. (1996). "Two distinct endothelial lineages in ontogeny, one of them related to hemopoiesis." Development **122**(5): 1363-1371.
- Perez-Pomares, J. M., R. Carmona, et al. (2004). "Contribution of mesothelium-derived cells to liver sinusoids in avian embryos." Dev Dyn **229**(3): 465-474.
- Pimanda, J. E., L. Silberstein, et al. (2006). "Transcriptional link between blood and bone: the stem cell leukemia gene and its +19 stem cell enhancer are active in bone cells." Mol Cell Biol **26**(7): 2615-2625.
- Pina, C. and T. Enver (2007). "Differential contributions of haematopoietic stem cells to foetal and adult haematopoiesis: insights from functional analysis of transcriptional regulators." Oncogene **26**(47): 6750-6765.
- Pucci, F., M. A. Venneri, et al. (2009). "A distinguishing gene signature shared by tumor-infiltrating Tie2-expressing monocytes, blood "resident" monocytes, and embryonic macrophages suggests common functions and developmental relationships." Blood **114**(4): 901-914.
- Purhonen, S., J. Palm, et al. (2008). "Bone marrow-derived circulating endothelial precursors do not contribute to vascular endothelium and are not needed for tumor growth." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(18): 6620-6625.

- Qin, G., M. Li, et al. (2006). "Functional disruption of $\alpha 4$ integrin mobilizes bone marrow-derived endothelial progenitors and augments ischemic neovascularization." J Exp Med **203**(1): 153-163.
- Rafii, S. and D. Lyden (2003). "Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration." Nat Med **9**(6): 702-712.
- Rebel, V. I., C. L. Miller, et al. (1996). "A comparison of long-term repopulating hematopoietic stem cells in fetal liver and adult bone marrow from the mouse." Exp Hematol **24**(5): 638-648.
- Reinisch, A., N. A. Hofmann, et al. (2009). "Humanized large-scale expanded endothelial colony-forming cells function in vitro and in vivo." Blood **113**(26): 6716-6725.
- Reyes, M., A. Dudek, et al. (2002). "Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow." J Clin Invest **109**(3): 337-346.
- Rybtsov, S., M. Sobiesiak, et al. (2011). "Hierarchical organization and early hematopoietic specification of the developing HSC lineage in the AGM region." J Exp Med **208**(6): 1305-1315.
- Samokhvalov, I. M., N. I. Samokhvalova, et al. (2007). "Cell tracing shows the contribution of the yolk sac to adult haematopoiesis." Nature **446**(7139): 1056-1061.
- Sanchez, M., B. Gottgens, et al. (1999). "An SCL 3' enhancer targets developing endothelium together with embryonic and adult haematopoietic progenitors." Development **126**(17): 3891-3904.
- Sanchez, M. J., E. O. Bockamp, et al. (2001). "Selective rescue of early haematopoietic progenitors in Scl(-/-) mice by expressing Scl under the control of a stem cell enhancer." Development **128**(23): 4815-4827.
- Sanchez, M. J., A. Holmes, et al. (1996). "Characterization of the first definitive hematopoietic stem cells in the AGM and liver of the mouse embryo." Immunity **5**(6): 513-525.
- Sands, M. S. and J. E. Barker (1999). "Percutaneous intravenous injection in neonatal mice." Lab Anim Sci **49**(3): 328-330.
- Sasaki, K., C. Heeschen, et al. (2006). "Ex vivo pretreatment of bone marrow mononuclear cells with endothelial NO synthase enhancer AVE9488 enhances their functional activity for cell therapy." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(39): 14537-14541.
- Schuh, A., E. A. Liehn, et al. (2008). "Transplantation of endothelial progenitor cells improves neovascularization and left ventricular function after myocardial infarction in a rat model." Basic Res Cardiol **103**(1): 69-77.

- Schulz, C., E. Gomez Perdiguero, et al. (2012). "A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells." Science **336**(6077): 86-90.
- Shalaby, F., J. Rossant, et al. (1995). "Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice." Nature **376**(6535): 62-66.
- Shiojiri, N., T. Niwa, et al. (2006). "Preferential expression of connexin37 and connexin40 in the endothelium of the portal veins during mouse liver development." Cell Tissue Res **324**(3): 547-552.
- Shivdasani, R. A., E. L. Mayer, et al. (1995). "Absence of blood formation in mice lacking the T-cell leukaemia oncoprotein tal-1/SCL." Nature **373**(6513): 432-434.
- Si-Tayeb, K., F. P. Lemaigre, et al. (2010). "Organogenesis and development of the liver." Dev Cell **18**(2): 175-189.
- Sieveking, D. P. and M. K. Ng (2009). "Cell therapies for therapeutic angiogenesis: back to the bench." Vasc Med **14**(2): 153-166.
- Silberstein, L., M. J. Sanchez, et al. (2005). "Transgenic analysis of the stem cell leukemia +19 stem cell enhancer in adult and embryonic hematopoietic and endothelial cells." Stem Cells **23**(9): 1378-1388.
- Silver, L. and J. Palis (1997). "Initiation of murine embryonic erythropoiesis: a spatial analysis." Blood **89**(4): 1154-1164.
- Stainier, D. Y., B. M. Weinstein, et al. (1995). "Cloche, an early acting zebrafish gene, is required by both the endothelial and hematopoietic lineages." Development **121**(10): 3141-3150.
- Stitt, A. W., C. L. O'Neill, et al. (2011). "Vascular stem cells and ischaemic retinopathies." Prog Retin Eye Res **30**(3): 149-166.
- Takahashi, T., C. Kalka, et al. (1999). "Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization." Nat Med **5**(4): 434-438.
- Taoudi, S., C. Gonneau, et al. (2008). "Extensive hematopoietic stem cell generation in the AGM region via maturation of VE-cadherin+CD45+ pre-definitive HSCs." Cell Stem Cell **3**(1): 99-108.
- Taoudi, S. and A. Medvinsky (2007). "Functional identification of the hematopoietic stem cell niche in the ventral domain of the embryonic dorsal aorta." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(22): 9399-9403.

- Taoudi, S., A. M. Morrison, et al. (2005). "Progressive divergence of definitive haematopoietic stem cells from the endothelial compartment does not depend on contact with the foetal liver." Development **132**(18): 4179-4191.
- Taylor, P. A., R. T. McElmurry, et al. (2002). "Allogenic fetal liver cells have a distinct competitive engraftment advantage over adult bone marrow cells when infused into fetal as compared with adult severe combined immunodeficient recipients." Blood **99**(5): 1870-1872.
- Trowbridge, I. S. and M. L. Thomas (1994). "CD45: an emerging role as a protein tyrosine phosphatase required for lymphocyte activation and development." Annu Rev Immunol **12**: 85-116.
- Vassord, C., C. Lapoumeroulie, et al. (2008). "Endothelial cells do not express GSTA1: potential relevance to busulfan-mediated endothelial damage during haematopoietic stem cell transplantation." Eur J Haematol **80**(4): 299-302.
- Vintersten, K., C. Monetti, et al. (2004). "Mouse in red: red fluorescent protein expression in mouse ES cells, embryos, and adult animals." Genesis **40**(4): 241-246.
- Vogeli, K. M., S. W. Jin, et al. (2006). "A common progenitor for haematopoietic and endothelial lineages in the zebrafish gastrula." Nature **443**(7109): 337-339.
- Weissman, I. L., S. Baird, et al. (1977). "Normal and neoplastic maturation of T-lineage lymphocytes." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **41 Pt 1**: 9-21.
- Wilson, N. K., S. D. Foster, et al. (2010). "Combinatorial transcriptional control in blood stem/progenitor cells: genome-wide analysis of ten major transcriptional regulators." Cell Stem Cell **7**(4): 532-544.
- Yoder, M. C., J. G. Cumming, et al. (1996). "A novel method of myeloablation to enhance engraftment of adult bone marrow cells in newborn mice." Biol Blood Marrow Transplant **2**(2): 59-67.
- Yoder, M. C. and K. Hiatt (1997). "Engraftment of embryonic hematopoietic cells in conditioned newborn recipients." Blood **89**(6): 2176-2183.
- Yoder, M. C., K. Hiatt, et al. (1997). "Characterization of definitive lymphohematopoietic stem cells in the day 9 murine yolk sac." Immunity **7**(3): 335-344.
- Yoder, M. C., K. Hiatt, et al. (1997). "In vivo repopulating hematopoietic stem cells are present in the murine yolk sac at day 9.0 postcoitus." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(13): 6776-6780.

- Yoder, M. C., L. E. Mead, et al. (2007). "Redefining endothelial progenitor cells via clonal analysis and hematopoietic stem/progenitor cell principals." Blood **109**(5): 1801-1809.
- Yokomizo, T. and E. Dzierzak (2010). "Three-dimensional cartography of hematopoietic clusters in the vasculature of whole mouse embryos." Development **137**(21): 3651-3661.
- Yong, K. L., A. Fahey, et al. (2002). "Fetal haemopoietic cells display enhanced migration across endothelium." Br J Haematol **116**(2): 392-400.
- Yoshimoto, M., E. Montecino-Rodriguez, et al. (2011). "Embryonic day 9 yolk sac and intra-embryonic hemogenic endothelium independently generate a B-1 and marginal zone progenitor lacking B-2 potential." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(4): 1468-1473.
- You, L. R., F. J. Lin, et al. (2005). "Suppression of Notch signalling by the COUP-TFII transcription factor regulates vein identity." Nature **435**(7038): 98-104.
- Young, P. P., A. A. Hofling, et al. (2002). "VEGF increases engraftment of bone marrow-derived endothelial progenitor cells (EPCs) into vasculature of newborn murine recipients." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(18): 11951-11956.
- Zape, J. P. and A. C. Zovein (2011). "Hemogenic endothelium: origins, regulation, and implications for vascular biology." Semin Cell Dev Biol **22**(9): 1036-1047.
- Zeng, L., L. Jia, et al. (2010). "Vascular endothelium changes after conditioning in hematopoietic stem cell transplantation: role of cyclophosphamide and busulfan." Transplant Proc **42**(7): 2720-2724.
- Zengin, E., F. Chalajour, et al. (2006). "Vascular wall resident progenitor cells: a source for postnatal vasculogenesis." Development **133**(8): 1543-1551.
- Ziegelhoeffer, T., B. Fernandez, et al. (2004). "Bone marrow-derived cells do not incorporate into the adult growing vasculature." Circ Res **94**(2): 230-238.
- Zorn, A. M. (2008). Liver development. StemBook. Cambridge (MA).
- Zovein, A. C., J. J. Hofmann, et al. (2008). "Fate tracing reveals the endothelial origin of hematopoietic stem cells." Cell Stem Cell **3**(6): 625-636.
- Zovein, A. C., K. A. Turlo, et al. (2010). "Vascular remodeling of the vitelline artery initiates extravascular emergence of hematopoietic clusters." Blood **116**(18): 3435-3444.

APÉNDICE

SOLUCIONES DE USO COMÚN

Solución de lavado fosfatasa alcalina para tinción NBT: para preparar 200ml de solución, hay que mezclar 174 ml de agua mili q con 20 ml de Tris HCl 1M a pH 9,5, 4ml de NaCl 5M y 2ml de MgCl 1M.

Solución de tinción NBT fosfatasa alcalina: para prepara 10ml de solución, se mezclan 8,1ml de agua mili q con 1ml de Tris HCl 1M a pH 9,5, 200µl de NaCl 5M, 500µl de MgCl 1M y 200µl de NBT/BCIP.

Solución de fijación para embriones SCL3'Enh-LacZ: para preparar 20ml de solución se mezclan 13.96 ml de PBS con 4ml de Paraformaldehido 4%, 160µl de Glutaraldehido 25%, 40µl de MgCl₂ 1M, y 833µl EGTA 0,12M.

Solución de lavado para embriones SCL3'Enh-LacZ: para preparar 100ml de solución, se disuelven 0,05g de BSA en 2ml de NP40 1%, 1ml de NaDxCholate 1%, 200µl de MgCl₂ 1M y se enrasa hasta 100ml con PBS.

Solución de tinción X-Gal de embriones SCL3'Enh-LacZ: para preparar 10ml de solución, se disuelven 200µl de X-Gal/DMF (50mg/ml), 100µl de KFerri 0,5M y 100µl K-Ferro-3H₂O 0.5M en la solución de lavado para embriones SCL3'Enh-LacZ descrita anteriormente hasta enrasar 10ml.

Tail buffer: para preparar 100ml de solución se mezclan 5ml de Tris 1M pH 8, 20ml de EDTA 0,5M, 2ml de NaCl 5M, 10ml de SDS10% y 63ml de agua mili q estéril.

TE 50X (Tris EDTA): para preparar 50 ml de solución se mezcla 25ml de Tris HCl 1M pH 8, 5ml de EDTA 0.5M pH 8 y 20ml de agua destilada estéril. A partir de este buffer, se prepara TE1x diluyendo con agua destilada estéril.

Tampón Tris-Borato-EDTA (TBE): para preparar 1 litro 10x, se disuelven 108 g de Tris base (890 mM) y 55 g de ácido bórico (890 mM) en 40 ml de EDTA 0,5 M pH 8,0 (20 mM). Se conserva a temperatura ambiente. Para su uso (1x ó 0,5x), se disuelve en la cantidad correspondiente de H₂O destilada estéril.

EDTA 0,5M pH8: para preparar 1 litro de solución inicialmente se cogen 600ml de H₂Odestilada y se añade 186.1g de EDTA. Mover la solución vigorosamente en el agitador y ajustar el pH a 8 con NaOH 10M. Enrasar la solución hasta tener 1 litro. Hay que tener en cuenta el EDTA no es soluble hasta que la solución no torna a básica.

Solución de lisis de eritrocitos para sangre periférica: para preparar 100ml de solución se mezclan 90ml de NH₄Cl 0,16M y 10ml de Tris 0,17M pH 7,65, y se ajusta el pH a 7,2 con HCl. Para las soluciones de stock, se prepara 1 litro de NH₄Cl 0.16M disolviendo 8,3g en un litro;

para Tris 0.17M se disuelve 20,6g de Tris base en 900ml de agua, se ajusta el pH a 7,65 con HCl y se enrasa hasta obtener 1 litro.

NaCl 5M: para preparar 1 litro se disuelven 292,2g en 1 litro de agua destilada estéril.

TBS (Tris Buffer Saline): para preparar 1 litro de solución a 10x (0.5M Tris Base, 9% NaCl, pH 7,6) se disuelven 61g de Tris base, 90g NaCl en agua destilada ajustando el pH a 7,6 usando HCl concentrado. Se almacena a temperatura ambiente. Se diluye 1:10 con agua destilada para preparar la solución de TBS a 1x con la que se trabaja. Para la perfusión, a 1litro de TBS 1x se añade 1ml de heparina.

PBlec: para preparar 50ml de esta solución se mezclan 44.98ml de PBS, 5ml Triton 10x, 5µl $MnCl_2$, 5µl $MgCl_2$ y 5µl $CaCl_2$.

PBT: PBS: para 500µl de solución a 492,5µl de PBS se añade 2,5µl de FCS y 5µl de Triton 10X

Tampón citrato sódico salino (SSC) 20x: para preparar 50 ml, se disuelven 8,76 g de NaCl y 4,41 g de citrato sódico en H_2O , ajustando el pH a 7,0. Se enrasa hasta 50 ml con H_2O . Las distintas concentraciones utilizadas se preparan a partir de ésta haciendo las correspondientes diluciones con H_2O .

ANEXO

Enhanced Hematovascular Contribution of SCL 3' Enhancer Expressing Fetal Liver Cells Uncovers Their Potential to Integrate in Extramedullary Adult Niches

ANTONIO M. GARCIA-ORTEGA,^a ANA CAÑETE,^a CRISTINA QUINTER,^a LEV SILBERSTEIN,^b MARINA PIQUER-GIL,^c MANUEL ALVAREZ-DOLADO,^c BENJAMIN DEKEL,^d BERTHILD GOTTGENS,^b MARÍA-JOSÉ SÁNCHEZ^a

^aCentro Andaluz de Biología del Desarrollo (CABD), CSIC, Universidad Pablo de Olavide, Seville, Spain;

^bDepartment of Haematology, Cambridge Institute for Medical Research, University of Cambridge, Cambridge, United Kingdom; ^cCentro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa (CABIMER), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Seville, Spain, and ^dDepartment of Pediatrics and Pediatric Stem

Cell Research Institute, Edmond and Lili Safra Children's Hospital, Chaim Sheba Medical Center, Sackler Faculty of Medicine, Tel Aviv University, Tel Aviv, Israel

Key Words. Fetal hematovascular progenitors • Fetal liver transplantation • SCL3'EnhPLAP reporter • Hematopoietic stem cells • Endothelial differentiation

ABSTRACT

Fetal liver (FL) hematopoietic progenitors have superior blood engraftment competence compared with adult bone marrow (BM), however less is known about FL in vivo vascular capacity. Here we show in transplantation assays that FL cells possess enhanced vascular endothelial potential compared with adult bone marrow. We generated high-level hematopoietic chimeras using donor cells from mice transgenic for the stem cell leukaemia 3' enhancer human placental alkaline phosphatase (SCL3'Enh-PLAP) reporter construct, active in vascular endothelium, and blood progenitor and stem cells. Long-term lineage tracing analysis revealed PLAP⁺ vascular-like patches in FL-derived chimeras, whereas adult BM-derived chimeras presented only rare and scattered PLAP⁺ cells. PLAP⁺ vascular-like patches were formed following transplantation into both newborn and

adult recipient mice, although their frequency was reduced in adult recipients. Confocal analysis of multiple labeled tissues revealed that whereas most liver and heart PLAP⁺ vascular patch-associated cells were endothelial, PLAP⁺ vascular patches in the kidney contained endothelial, hematopoietic, and putative hemangioblastic cells. Moreover, fluorescence-activated cell sorting assays showed that only FL PLAP^{bright+} donor cells can generate PLAP⁺ vascular patches upon transplantation. Taken together, these data demonstrate superior vascular contribution potential of FL cells, and not only provide new insights into the developmental pathways controlling endothelial development but also may prove informative when addressing the mechanisms involved in vascular regeneration and hemangiogenic recovery in a clinical context.

STEM CELLS 2010;28:100–112

Disclosure of potential conflicts of interest is found at the end of this article.

INTRODUCTION

Cells that can contribute to vasculature in vivo have exciting clinical potential for the replacement and regeneration of damaged vessels and ex vivo reconstruction of organs. Until now, very few cell types have been identified that can integrate/differentiate to vascular cells in nonischemic tissue upon transplantation. Among these are the cells derived from the adult bone marrow. However, although transplanted bone marrow cells into irradiated recipient mice efficiently restore the blood lineages, contribution to vascular cells is a rare and isolated event, even after enrichment of diverse progenitor

populations with endothelial potential, including hematopoietic stem cells and myeloid progenitor cells [1–3]. By contrast, vascular incorporation of bone marrow-derived cells is readily observed when extensive vascular damage is enforced and in response to signals related to vascular endothelial-derived growth factor [4–6]. Bone marrow-derived cells recruited to sites of induced neoangiogenesis are of diverse nature, including proper endothelial cells, myeloid cells, and pericytes [7]. Still, even under acute ischemic challenges, the relative contribution of bone marrow-derived endothelial cells to adult organs is highly variable, ranging from minor [8–12] to major [4, 13] contribution. This has led to questioning the specific circumstances in which bone marrow-derived

Author contributions: A.M.G.-O. and A.C.: collection and assembly of data, data analysis and interpretation; C.Q. and M.P.-G.: collection and assembly of data; L.S.: collection and assembly of data, manuscript writing; M.A.-D.: data analysis and interpretation; B.D.: manuscript writing; B.G.: manuscript writing, provision of study material; M.J.S.: conception and design, financial support, data analysis and interpretation, manuscript writing.

Correspondence: María-José Sánchez, Ph.D., Centro Andaluz de Biología del Desarrollo (CABD), CSIC-Universidad Pablo de Olavide, Carretera de Utrera km1, 41013 Seville, Spain. Telephone: 0034-954-348-943; e-mail: mjsansan@upo.es Received April 2, 2009; accepted for publication September 11, 2009; first published online in STEM CELLS EXPRESS September 25, 2009. © AlphaMed Press 1066-5099/2009/\$30.00/0 doi: 10.1002/stem.228

endothelial progenitor cells are active, including differences in ischemia stress, nature of angiogenic stimulus, or even the targeted organ [14]. Although controversy remains, the general idea is that adult bone marrow-derived cells associated with neovasculature provide signals that promote proliferation and survival of resident endothelial cells but have limited vascular endothelial differentiation or endothelial proliferative potential once transplanted [11, 15]. Therefore the search for cell progenitor sources with substantial vascular endothelial potential remains an important area of scientific research to be explored.

During development the vasculature develops in close association with the hematopoietic system. Early in development blood and endothelial cells arise in a coordinated fashion in the blood islands of the yolk sac. As development continues, other locations with hematopoietic activity associated with vasculature appear in the embryo proper such as the dorsal aorta in the aorta-gonads-mesonephros (AGM) region [16–18], vitelline vessels, and placental vasculature [19, 20]. Blood and endothelium share many markers and regulatory pathways and the existence of the long hypothesized common hemato-vascular progenitor, the hemangioblast, has been demonstrated in vitro using embryonic stem cells [21] and also in early embryonic stages of the mouse and the zebrafish [22, 23]. Progenitor cells with in vitro endothelial differentiation potential have been localized in all embryonic/fetal tissues associated with hematopoietic activity, such as the yolk sac [24], the AGM region [25], and the fetal liver [26]. In some cases it was demonstrated that a specific VE-Cad⁺CD45⁺ AGM-derived cell population containing hematopoietic stem cell (HSC) activity is capable of in vitro differentiation to endothelial cells [25]. Furthermore, in vitro clonal hemato-vascular differentiation assays of high proliferative potential precursors also point to the existence of a hemangioblastic progenitor in the AGM region [27]. Although certain controversy remains, and some data clearly demonstrate the existence of a hierarchy of endothelial progenitor population divergent from hematopoietic cells [28], a lineage relationship between hematopoietic and endothelial differentiation during embryonic/fetal stages is currently accepted [29–31].

Developmental changes in the properties of different hematopoietic cell populations have long been recognized [32]. Fetal HSCs differ from adult HSCs in differentiation potential [33, 34], gene expression [35], markers [17, 36], and molecular regulation [37]. For example, fetal liver cells transplanted into irradiated recipients have an extended engraftment potential and impose their particular properties when cotransplanted with adult bone marrow (BM) cells in competitive assays [38–40]. Recently it was described that HSC transition from fetal to adult properties occurs 2–3 weeks after birth in mice [41, 42]. Although the mechanisms are not well understood, the engraftment advantages of fetal liver (FL)-derived cells are most likely associated with their high proliferating status compared with the largely quiescent nature of adult BM-derived HSCs [43]. Other distinctive properties of fetal liver progenitor cells are their capacity to give rise to myeloid-skewed grafts [42] and to specific subsets of T V γ 3⁺ and B-1 lymphocytes [33, 41]. Considering their enhanced hematopoietic capacity and the specific cell lineage outcome, we hypothesized that FL cells might also possess significant potential to contribute to vasculature in transplantation assays.

Using the stem cell leukaemia 3' enhancer human placental alkaline phosphatase (SCL3'Enh-PLAP) reporter construct for lineage tracing of vascular and putative resident stem/progenitor cells following transplantation, we demonstrate vastly superior capacity of fetal liver-derived cells to generate integrated vascular patches compared with BM-derived cells. FL-

derived patches are composed mostly of either PLAP⁺ endothelium or a mixture of PLAP⁺ endothelium and progenitor cells depending on the target organ.

MATERIALS AND METHODS

Mice

All mice used were of the (C57BL/6 \times CBA) background. SV/PLAP/19 (denominated SCL+19-hPLAP) transgenic mice expressing the human placental alkaline phosphatase gene under the regulatory elements of the SCL 3' enhancer (+19 region) were used [44]. SCL+19-hPLAP transgenic mice were generated at the Cambridge University Biological Services and maintained in a breeding colony in the animal care facility at the Centro Andaluz de Biología del Desarrollo, Universidad Pablo de Olavide. All protocols were performed under the guidance of European community legislation with the approval of ethical committee of CSIC and Universidad Pablo de Olavide. Bone marrow cells were obtained from SCL+19-hPLAP transgenic mice and prepared as previously described [45]. To obtain fetal tissue, timed breeding of transgenic females with males was established. The day on which the plug was found was designated as day 0 of gestation. Fetuses were obtained at day 12 of gestation (E12), fetal liver was removed, and yolk sac was used for embryo typing by PLAP-polymerase chain reaction (PCR) and nitroblue tetrazolium (NBT) staining for detection of reporter gene as described [44].

Transplantation Studies

Newborn transplantation assays. To generate chimeric mice we followed the protocol previously published [46] based on the method described by Yoder et al. [47] and Sands and Barker [48], with modifications (supporting information Materials and Methods). Adult BM (5×10^6), E12 FL (1×10^6), fluorescence-activated cell sorting (FACS) sorted PLAP^{bright+} (5×10^4), or PALP⁺ E12 FL ($5\text{--}500 \times 10^4$) cell suspension was injected in 50 μ l of Dulbecco's phosphate-buffered saline (D-PBS), 1% fetal calf serum.

Adult transplantation assays. C57BL/6 \times CBA recipient female mice (3–4 months old) were exposed to split dose of total 1,000 rads from an x-ray (CP-160; Faxitron X-Ray, Toronto, ON, Canada, <http://www.faxitron.com>) or a Cs source (Cambridge Biomedical Services, Cambridge University, Cambridge, United Kingdom), delivered 2 hours apart as previously described [45]. Adult BM (5×10^6) or E12 FL (1×10^6) cell suspension of donor transgenic cells was coinjected with 250,000 spleen cells from nontransgenic mice to provide protection from lethal irradiation. Cells were resuspended in 300 μ l of D-PBS and injected into the tail vein.

Hematopoietic Engraftment

To test the contribution of donor HSCs to different hematopoietic lineages, transplanted mice were sacrificed at 5–10 months after transplantation (long-term transplanted mice). A week before sacrificing, peripheral blood was drawn from the tail and cells analyzed by FACS for PLAP and CD45 expression as previously described [46, 49] (supporting information Materials and Methods). A FACSAria flow cytometer (BD Biosciences, San Diego, <http://www.bdbiosciences.com>) was used. Chimeric animals presenting comparable levels of FACS-PALP⁺ cells to SCL+19-hPLAP transgenic donor animals were selected for further analysis. To confirm multilineage hematopoietic engraftment genomic DNA was isolated from blood, spleen, lymph nodes, thymus, and bone marrow or from FACS-sorted cells: B220 (B cells), CD4⁺CD8 (T cells), Mac-1 (myeloid cells), and Ter119 (erythroid cells). Antibodies were fluorescein isothiocyanate (FITC) or phycoerythrin conjugated and purchased from BD Pharmingen (San Diego, <http://www.bdbiosciences.com>). Semiquantitative PCR using primers

for the PLAP, YMT2/B, and myogenin genes was used to determine the level of donor chimerism as described [44, 50]. Percentage donor-cell contribution was estimated by Gel-Pro Analyzer software (Media Cybernetics, Inc., Bethesda, MD, USA, <http://www.mediacy.com>) using myogenin as the DNA normalization control. Normalized values were integrated into the curve obtained with serial dilutions of genomic DNA from transgenic mice as described [17].

Histochemical Detection of PLAP by NBT Staining

For histological analysis mice were anesthetized and perfused with Tris-buffered saline (TBS). Perfusion of 20–40 ml TBS was applied at an average speed of 7 ml/minute. Tissues were removed, placed in zinc fixative (BD Biosciences), and cut to a thickness of 3–6 mm [51]. Fixation was performed for 18–24 hours. Tissues were dehydrated in ascending ethanol concentration and processed into Histosec paraffin wax (Merck & Co., Whitehouse Station, NY, <http://www.merck.com>). Sections of 5–6 μm were placed on Star Frost electrostatically charged slides (Knittel Glaeser, Brunswick, Germany, <http://www.knittel-glaeser.de>) and analyzed for PLAP activity by NBT staining as described [44] (supporting information Materials and Methods). To quantify the NBT scattered signal we used a light microscope (Leica DM5000B) in combination with a digital camera (Leica DC-180), the image acquisition program IM50 (Leica) and the image AnalySIS software program V3.1.110 (Soft Imaging System GmbH, Muenster, Germany, <http://www.soft-imaging.net>). For quantification procedures refer to supporting information Fig. 1 and supporting information Table 1.

Immunohistochemistry

Recipient tissues were harvested after perfusion, fixed in zinc (BD Pharmingen), and processed in paraffin. The following primary antibodies were used at the indicated concentration: anti-hPLAP (1:10 dilution, AbD; Serotec Ltd., Oxford, U.K., <http://www.serotec.com>), anti-CD31 (1:20, MEC13.3; BD Pharmingen), anti-CD34 (1:20, RAM34; BD Pharmingen), anti-CD45 (1:100, 30-F11; BD Pharmingen), anti-F4/80 (1:100, BM8; Caltag, Laboratories, Burlingame, CA, USA, <http://www.caltag.com>), biotinylated anti-CD3 (145-2C11; BD Pharmingen), biotinylated anti-CD45bio (1:100, 30-F11; BD Pharmingen), cyanin 3 (Cy3) anti- α -smooth muscle actin (1:100, 1A4; Sigma-Aldrich, St. Louis, <http://www.sigmaaldrich.com>), and biotinylated BS-1 isolectin B4 [52] (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$, L2140; Sigma-Aldrich). The following secondary antibodies were used: Cy5-conjugated streptavidin (1:100; Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, <http://www.jacksonimmuno.com>), Alexa Fluor 488-, 568-, and 647- conjugated goat anti-rabbit (1:500; Invitrogen, Molecular Probes, Eugene, OR, USA, <http://probes.invitrogen.com>), and Alexa Fluor 488-, 568-, and 647- conjugated goat anti-rat (1:500; Invitrogen, Molecular Probes) (for tissue sections staining protocol see supplemental information). Images were obtained with a Leica DM2500/TCS SPE (Leica Microsystems, Barcelona, Spain, <http://www.leica-microsystems.com>) confocal microscope using a LAS AF software equipped with a 488, 532, and 635 laser and with a Delta Vision system with an Olympus IX-71 microscope (Applied Precision, Issaquah, WA, <http://www.api.com>).

Y Chromosome Fluorescence In Situ Hybridization

Y chromosome fluorescence in situ hybridization (Y-FISH) analysis was performed on zinc-fixed paraffin-embedded liver tissue sections from recipient female mice presenting high-level male hematopoietic chimerisms using the previously published protocol from Toth et al [53], with modifications (<http://info.med.yale.edu/labmed/faculty/labs/kruselab/index.html>) (supporting information Materials and Methods).

Flow Cytometry

For flow cytometry sorting and analysis, E12 fetal liver cells were stained following previously published protocols [44, 49]. High-speed FACSaria flow cytometer sorter (BD Biosciences) was used (supporting information Materials and Methods).

RESULTS

Fetal Liver-Derived Cells Form SCL3'Enh-PLAP⁺ Vascular-Like Structures in Transplantation Experiments

To assess the vascular contribution of genetically marked fetal liver-derived cells long-term transplantation chimeras were generated. We transferred cells into the bloodstream of busulfan-treated newborn mice, a reported model of active vasculogenesis [54], as well as a model to test hematopoietic stem cell function [47, 55]. Donor cells were derived from transgenic mice carrying the SCL3'Enh-PLAP reporter gene (SCL+19-hPLAP). Our previous work on the regulatory elements of the stem cell leukemia (SCL/Tal-1) gene, essential for normal hematopoiesis and proper vascular development, had identified the +19 3' enhancer, active in transgenics in hematopoietic progenitors and stem cells as well as in vascular endothelium, some vascular muscular cells, and osteoblasts [44, 45, 49, 56, 57]. Of note, the PLAP reporter gene offered advantages over other reporter genes such as GFP, which has been reported to interfere with endothelial growth [58], or LacZ, which could be vulnerable to epigenetic inactivation [44] and produces high background levels in adult tissues [8].

Other groups have shown that endothelial cells can be clonally derived from transplanted adult bone marrow HSCs [1, 4]. To compare the vascular contribution potential of fetal and adult cells we transplanted 5×10^6 total adult bone marrow or 10^6 total fetal liver cells containing equivalent numbers of SCL+19-PLAP^{bright+} cells (3×10^4 to 6×10^4) (Fig. 1A). Previously published data showed that PLAP^{bright+} from FL and adult BM contained a similar frequency of HSCs [44], (4 of 13 and 4 of 14 animals presented Long term reconstitution-hematopoietic engraftment, for FL and adult BM, respectively, when 10^3 – 10^4 PLAP^{bright+} cells were transplanted). The number of cells transferred here ensured the generation of chimeras with strong, long-term levels of hematopoietic contribution. This can be a relevant factor considering that a correlation between the levels of donor hematopoietic and endothelial cell engraftment was previously suggested [1].

Screening for high-level hematopoietic chimeras was performed 4–5 months after transplantation. Peripheral blood was analyzed by FACS-PLAP (Fig. 1B) and semiquantitative PCR-PLAP (Fig. 1C). Chimeric mice presenting similar high levels of PLAP⁺ cells in circulation were selected ($10\% \pm 2\%$ and $13\% \pm 5\%$ PLAP⁺ cells in FL and BM chimeras, respectively, compared with $11\% \pm 5\%$ PLAP⁺ cells in the donor transgenics) (Table 1). Selected individuals were sacrificed and further confirmation of high-level hematopoietic chimerism was assessed by semiquantitative PCR-PLAP in hematopoietic organs (BM, spleen, thymus, and lymph nodes) (Fig. 1C). Specific blood cell lineage contribution (B220, Mac1, Ter119, and CD4/8) was also confirmed by PCR in some chimeras (not shown).

To assess the incorporation of SCL+19-hPLAP⁺ cells into the vasculature, perfused livers from recipient mice were sectioned and PLAP⁺ cells localized by NBT staining. Liver sections from FL chimeras presented two patterns of distribution of PLAP⁺ cells: one pattern forming PLAP⁺ vasculature-like patched structures surrounding the hepatocytes (Fig. 2E, 2F) and a second pattern of PLAP⁺ scattered cells not forming an obvious network. PLAP⁺ patches are not observed in adult-BM chimeras; only scattered cells are present (Fig. 2G). The cells forming part of the scattered pattern are frequently

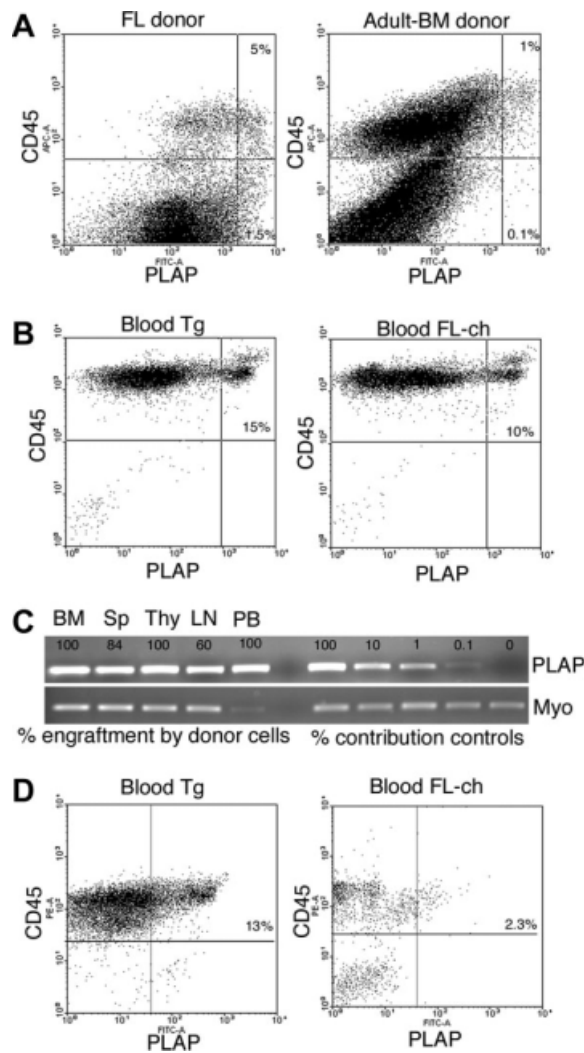


Figure 1. Analysis of hematopoietic chimeras. Newborn mice received a transplant of FL and adult BM cells derived from SCL+19-hPLAP transgenic mice and high level engrafted mice analyzed at different times after transplantation. **(A):** Flow cytometry profiles of donor-derived cells are shown for CD45 and PLAP expression for day 12 of gestation fetal liver and adult BM. **(B):** Flow cytometry profiles of peripheral blood are shown for CD45 and PLAP expression for a transgenic and a long-term engrafted (7 months) FL chimera. **(C):** Semi-quantitative polymerase chain reaction (PCR)-PLAP analysis of hematopoietic organs from long-term engrafted representative FL chimera: DNA was isolated from BM, Spl, Thy, LNs, PB. PCR analysis was performed using oligonucleotides for PLAP and Myo genes. The percentage of donor cell engraftment for contribution controls is 100, 10, 1, 0.1, and 0 PLAP signal with myogenine as the normalization standard. Percentage engraftment by donor cells indicated for each band was calculated using Gel-Pro software. **(D):** Flow cytometry profiles of peripheral blood for CD45 and PLAP expression in 3-week-old transgenic and short-term FL chimera. In **(A)** and **(B)**, represented quadrants are set to determine the percentage of high-expressing PLAP cells, associated with HSC activity as previously published. In **(C)** represented quadrants are set according to values obtained from isotype controls. Abbreviations: BM, bone marrow; FL-ch, fetal liver chimera; LN, lymph node; Myo, myogenin; PB, peripheral blood; PLAP, placental alkaline phosphatase; Spl, spleen; Tg, transgenic chimera; Thy, thymus.

clustered around the portal areas in the liver or distributed throughout the hepatic parenchyma cells, similarly to reports by other groups [2] (Fig. 2H). Although all FL chimeras presenting high-level hematopoietic engraftment presented NBT⁺

vascular patches, the number of patches within the sections analyzed was variable (Table 1). Two low-level hematopoietic engrafted FL chimeras (1.4% and 3% FACS-PLAP⁺ cells in PB and <10% PCR-PLAP in hematopoietic organs) presented few NBT⁺ scattered cells and no NBT⁺ vascular-like patch in liver sections. None of the five analyzed transplant recipients negative for hematopoietic engraftment displayed NBT staining in liver sections. This suggests a correlation between the level of donor hematopoietic and NBT vascular-like patch generation when transplanted into newborns. However larger number of animals will be required to establish this relationship.

To follow the emergence of the SCL+19-hPLAP⁺ vascular patches after transplantation we performed analysis of mice 3 weeks after transplant. Selected chimeras presented 1%–3% FACS-PLAP⁺ cells in circulation (Table 1) and 100% PCR-PLAP signal in hematopoietic organs (not shown). Livers from 2 FL chimeras and 2 BM chimeras were completely sectioned and NBT stained. Only very small PLAP⁺ patches were observed in FL chimeras together with scattered cells around the big vessel (Fig. 2I, 2J). Almost no liver PLAP⁺ cells were detected in 3-week-old bone marrow chimeras, in accordance with results shown by others [54]. This suggested that the size increment of the FL-derived patches occurs with time, similar to the expansion of the hematopoietic cell populations after transplantation [59, 60].

Reports in the hematopoietic [61] as well as in the neural [62] system have indicated that transplanted cells have a higher probability of integration/engraftment if recipient and donor tissues are at an appropriate stage of development. To determine whether the newborn recipient environment provided an advantage for FL cells to contribute to vasculature, we analyzed how transplantation into adult irradiated mice could affect vascular-like patch formation. High-level hematopoietic chimeras were selected 5–10 months after transplantation and liver sections analyzed for NBT signal. Integrated vascular-like patches of SCL+19-hPLAP⁺ cells were observed in FL chimeras but not in BM chimeras (Fig. 2K, 2L, and data not shown). However the efficiency of FL vascular contribution is likely to be compromised as only 3 of five animals exhibiting a high level of hematopoietic chimerism presented PLAP⁺ liver patches. These data demonstrate that fetal cells could form PLAP⁺ vascular-like patches when transferred to an adult environment. It also confirms the limitations of adult BM-derived cells to contribute to PLAP⁺ vascular-like patches even when transplanted into adult environment.

We also noticed an apparent increase in PLAP⁺ scattered signal in FL chimeras compared with BM chimeras. To determine whether these differences were statistically significant we systematically quantified the scattered PLAP⁺ signal as indicated in Material and Methods. Results showed a consistent increase of PLAP⁺ cells in liver sections from FL long-term chimeras ($1.2\% \pm 1.1$ vs. $0.5\% \pm 0.3$, $p < .1$, of NBT scattered signal in FL and BM chimeras, respectively), FL short-term chimeras ($2.8\% \pm 2.5$ vs. $0.4\% \pm 0.4$, $p < .1$, NBT scattered signal in FL and BM chimeras, respectively), as well as FL long-term irradiated chimeras ($1\% \pm 0.4$ vs. $0.15\% \pm 0.1$, $p < .04$, NBT scattered signal in FL and BM chimeras, respectively) (Table 1). Similar differences were obtained in kidney sections from FL long-term chimeras ($3.18\% \pm 1.5$ FL chimera vs. $1.5\% \pm 1$ BM chimera), short-term chimeras ($2.9\% \pm 1.5$ FL chimera vs. $1.5\% \pm 0.5$ BM chimera), and FL long-term irradiated chimeras ($3.7\% \pm 2$ vs. $1\% \pm 0.9$) (Table 1). This observation might reflect a unique enhanced capacity of fetal-derived PLAP⁺ progenitor/stem cells to access or “nest” the organs. Indeed, previous

Table 1. Assessing SCL3⁺EnhPLAP⁺ engrafted cells in nonhematopoietic tissues by detection of PLAP by 5-bromo-4-chloro-indolyl-phosphatase/NBT substrate staining

Recipient/ Donor	Time after transplantation	Blood ^a	Liver		Kidney		Heart	
		% FACS-PLAP ⁺	NBT ⁺ patch ^b	% NBT ⁺ scattered signal ^c	NBT ⁺ patch	% NBT ⁺ scattered signal	NBT ⁺ patch	% NBT ⁺ scattered signal ^d
Bu-newborn								
FL (<i>n</i> = 6)	5–10 mo	10 ± 2	+++	1.27 ± 1.1	++	3.18 ± 2	+	0.39 ± 0.2
A-BM (<i>n</i> = 5)	5–10 mo	13 ± 5	–	0.54 ± 0.3	–	1.5 ± 0.2	–	0.23 ± 0.1
FL (<i>n</i> = 6)	3–8 wk	3.4–2.4 ^e	+	2.8 ± 2.5	–	2.9 ± 1.5	ND	ND
A-BM (<i>n</i> = 6)	3–8 wk	2.3–1 ^e	–	0.4 ± 0.4	–	1.5 ± 0.5	ND	ND
FL-PLAP ^{bright+} (<i>n</i> = 5)	5–8 mo	12 ± 5	+++	ND	ND	ND	ND	ND
FL-PLAP ^{neg-low} (<i>n</i> = 9)	4–9 mo	<0.1	–	0.0	ND	ND	ND	ND
Rx-Adult								
FL (<i>n</i> = 5)	5–10 mo	9.5 ± 1.6	+++ (<i>n</i> = 3)	1.0 ± 0.4	++ (<i>n</i> = 2)	3.7 ± 2	ND	ND
A-BM (<i>n</i> = 6)	5–10 mo	10–7.2	–	0.1 ± 0.1	–	1.0 ± 0.9	ND	ND

^aPercentage of PLAP⁺ cells in circulation is determined by FACS analysis. Values for controls: adult transgenic, 11 ± 5; 3-week-old transgenic, 19 ± 2; wt, 0%.

^bNBT⁺ areas are considered a patch if a continuous signal is distributed over an area of ≥100–300 μm². The relative values are assigned as following: +++ (high frequency), at least a NBT⁺ patch is detected in every 5-10 nonconsecutive sections; ++ (lower frequency), at least a patch is detected in every 10-20 nonconsecutive sections; + (very low frequency), a patch is detected at least once; –, no patch detected.

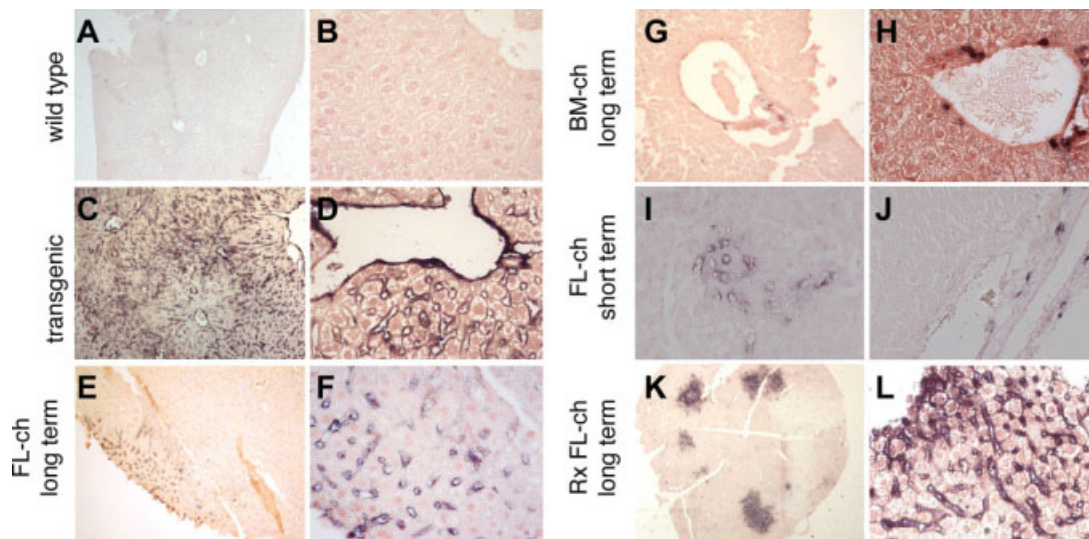
^cPercentage of NBT⁺ signal relative to total tissue analyzed. Color image segmentation in red-green-blue images used for quantification is shown in supporting information Figure 1. The percentages shown represent the mean value and standard error for all chimeras included in each experimental group. Representative pictures for scoring NBT⁺ signal are shown in Figure 2B, 2D, 2F, 2H, 2J, and 2L and supporting information Figure 4b, 4d, 4f, 4h, 4j, 4k. NBT values for positive transgenic controls: liver, 14.6 ± 05 (Fig. 2B); kidney, 14 ± 1 (supporting information Fig.4b); heart, 18 ± 0.3 (supporting information Fig.4h). No signal was detected in tissues from nontransgenic controls (Fig.2A; supporting information Fig. 4a, 4g).

^dNonrandom determination. Only fields with at least one NBT⁺ cell were considered for quantification.

^eOnly two chimeras were analyzed by FACS.

Number of transplanted donor cells: FL, 1 × 10⁶; A-BM, 5 × 10⁶; sorted FL-PLAP^{bright+}, 5 × 10⁴; sorted FL-PLAP^{neg}, 5 × 10⁴ (*n* = 1), 5 × 10⁵ (*n* = 5), 5 × 10⁶ (*n* = 3).

Abbreviations: A-BM, adult bone marrow; Bu, busulfan; FACS, fluorescence-activated cell sorting; FL, fetal liver; mo, months; NBT, nitroblue tetrazolium; ND, not determined; PLAP, placental alkaline phosphatase; Rx, irradiated; wk, weeks.

**Figure 2.** Transplanted fetal cells form vascular-like patches. Histochemical detection of placental alkaline phosphatase (PLAP) activity was detected by nitroblue tetrazolium (NBT) staining (purple stain) in paraffin sections from the liver. (A, B): Liver sections from negative control wild-type mice. (C, D): Sections from positive control transgenic mice showing NBT staining in the vascular network. (E–L): Sections from chimeric mice. Recipient mice received a transplant of either FL or adult BM cells derived from SCL3⁺hPLAP transgenic mice and high-level hematopoietic engrafted mice were analyzed. (E, F): Sections from long-term FL-ch showing PLAP⁺ vascular-like patches. (G, H): Sections from long-term BM-ch presented PLAP⁺ scattered signal around hepatic portal areas. No vascular patches were detected. (I, J): Sections from short-term FL-ch showing small vascular-like patches (I) and scattered signal. (K, L): Sections from long-term FL-ch generated upon transplantation of donor cells into irradiated adult recipient mice. Pictures were taken with a Leica DM5000B microscope at different magnifications (images in [A, K] are ×250 magnification; images in [C, E, G] are ×100 magnification; images [B, D, F, H–J, L] are ×400 magnification). FL-ch and BM-ch were generated upon transplantation of donor cells into busulfan-treated newborn recipient mice. Fetal liver chimeras were generated upon transplantation of donor cells into irradiated adult recipient mice. Abbreviations: BM-ch, bone marrow chimera; FL-ch, fetal liver chimera; Rx, irradiated.

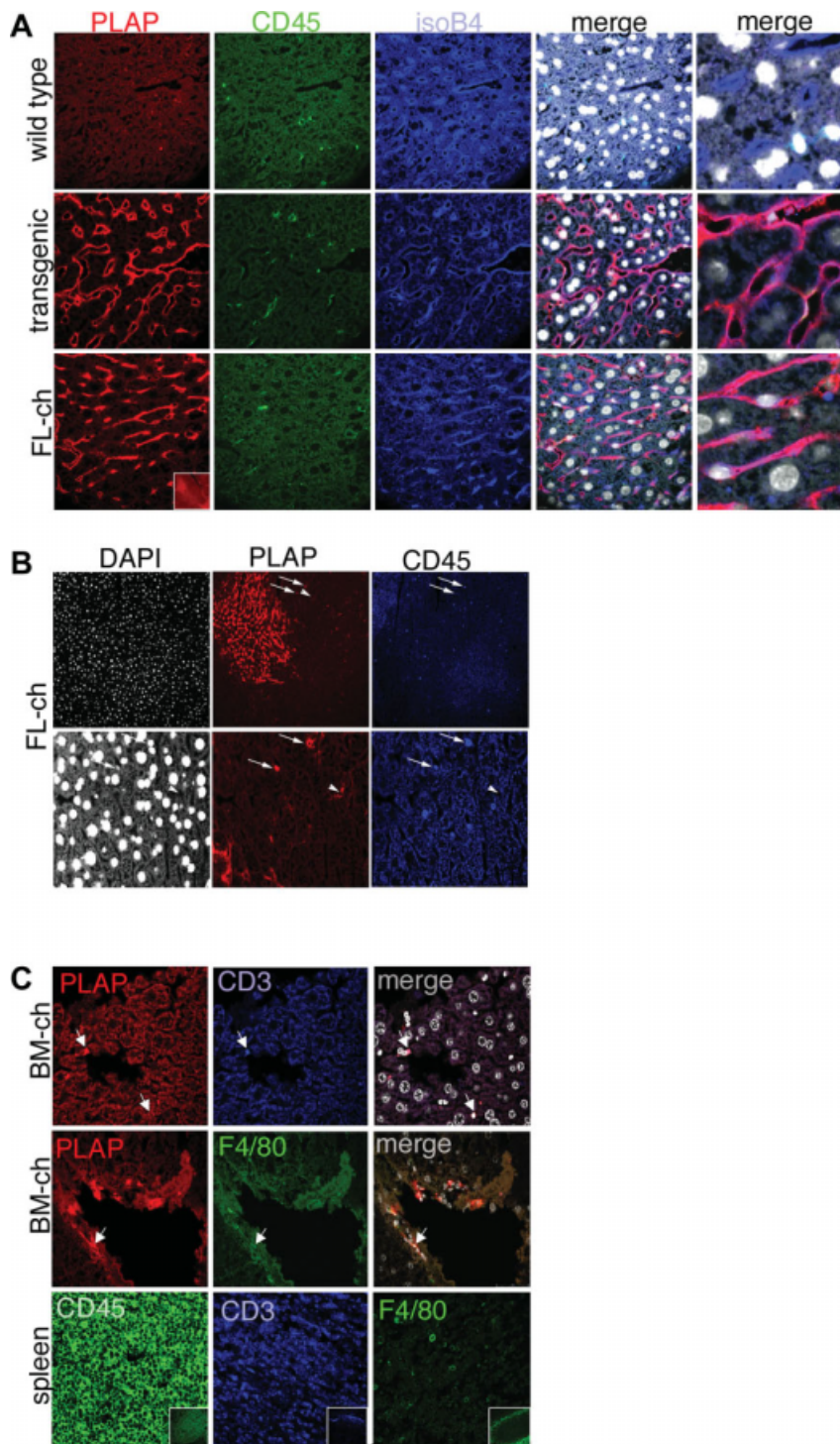


Figure 3. SCL3/Enh-PLAP⁺ cells forming vascular-like patches in the liver are endothelial cells. **(A):** Characterization of cells in vascular patches. Confocal immunofluorescence images of liver sections from wild-type (upper panel), SCL3/Enh-PLAP transgenic (intermediate panel) and SCL3/Enh-PLAP FL-derived chimeric mice (lower panel) are shown. Sections were costained with anti-PLAP (red) and anti-CD45 (green) followed by incubation with secondary antibodies. After extensive wash in PBS, biotin conjugated isolectin B4 (blue) was added and incubated ON followed by incubation with streptavidin-cyanin 5 (Cy5). Slides were mounted in medium containing DAPI (light/dark gray nuclei). Merged image showed that similarly to the transgenic, the vast majority of PLAP⁺ cells are negative for the pan leukocyte marker CD45 and coexpress the endothelial associated marker IsoB4. **(B):** Characterization of scattered PLAP⁺ cells in FL chimeras. Most PLAP⁺ scattered cells (red) coexpress CD45 (blue) (arrows). In some cases PLAP⁺ signal is not associated with CD45 and does not present DAPI staining (arrowhead) possibly corresponding to cytoplasmic extensions of endothelial cells (arrowhead). Magnification top panel $\times 100$. Lower panel represents $\times 400$ magnification of the field containing the arrows. **(C):** Characterization of scattered cells. Liver section from BM chimeras (top and middle panel) and spleen sections (lower panel) are shown. Liver sections were costained for anti-PLAP and biotin-conjugated anti-CD3 followed by A568-conjugated goat anti-rabbit and streptavidin-Cy5 (top panel) or anti-PLAP and anti-F4/80 (middle panel), followed by Alexa568-conjugated goat anti-rabbit and Alexa 488-conjugated goat anti-rat. Double positive cells are identified among the PLAP⁺ scattered cells (arrows). Single staining with indicated antibodies was performed on spleen sections used as controls for antibody reactivity. Images were obtained with a Leica DM2500/TCS SPE confocal microscope using a LAS AF software equipped with a 488, 532, and 635 laser. Magnification is as followed: lower case are taken at $\times 200$; merged images on the far right in (A) are $\times 600$ with zoom; rest of the pictures at taken at $\times 400$. Abbreviations: BM-ch, bone marrow chimera; DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole; FL-ch, fetal liver chimera; IsoB4, isolectin B4; PLAP, placental alkaline phosphatase.

result from other groups showed that fetal hematopoietic cells presented an enhanced trans-endothelial migratory capacity [63]. However, as most long-term PLAP⁺ circulating cells are CD4/CD8⁺ T-cell lymphocytes in both FL and BM chimeras (not shown), we cannot exclude that the nesting properties might be associated with a particular FL-derived lymphoid population.

Altogether these results demonstrate the unique capacity of fetal liver cells to generate liver PLAP⁺ vascular-like

patches when transplanted into newborn and adult irradiated recipients.

Donor-Derived Cells Expressing the SCL3/Enh-PLAP reporter construct in the Liver Vascular-Like Patches Are Endothelial Cells

To assess the hematopoietic or vascular nature of PLAP⁺ cells we performed immunofluorescence staining and confocal

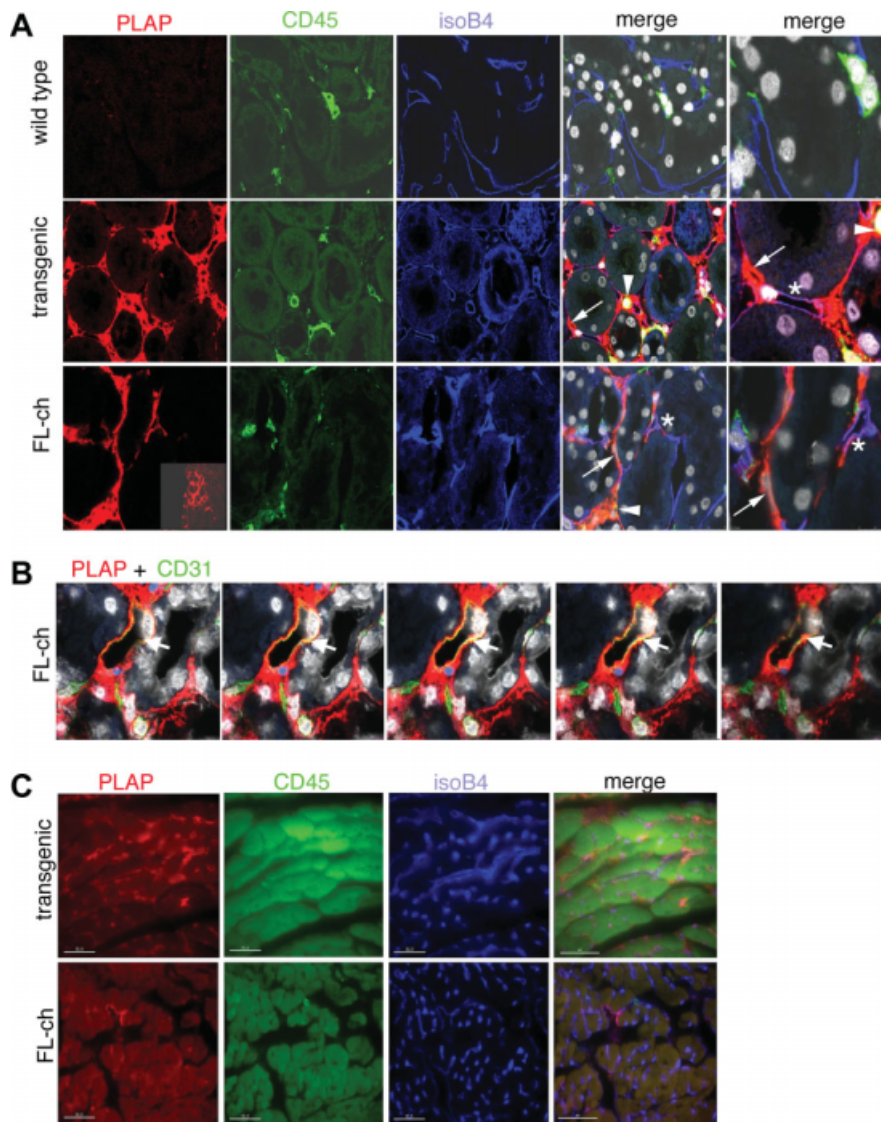


Figure 4. SCL3'Enh-PLAP⁺ cells forming vascular-like patches in kidney are hematopoietic, endothelial, and interstitial cells. **(A):** Confocal immunofluorescence images of kidney sections from wild-type (top panel), SCL3'Enh-PLAP transgenic (middle panel), and SCL3'Enh-PLAP FL-derived chimeric mice (lower panel) costained with anti-PLAP (red), anti-CD45 (green), isolectin B4 (blue), and 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; light/dark gray) as indicated in Figure 3. Three types of cells are identified in the merged image: PLAP⁺CD45⁻IsoB4⁻ (arrows); PLAP⁺CD45⁻IsoB4⁺ (asterisks); PLAP⁺CD45⁺IsoB4⁻ (arrow heads). **(B):** Confocal Z-stack analysis of sections stained with anti-PLAP (red), anti-CD31 (green), and DAPI (light/dark gray). Pictures series were taken at 1- μ m intervals. Coexpression of CD31 and PLAP can be observed in the same cells (arrow). **(C)** Images of heart sections from SCL3'Enh-PLAP transgenic (top panel) and SCL3'Enh-PLAP FL-derived chimeric mice (lower panel) costained with anti-PLAP (red), anti-CD45 (green), and isolectin B4 (blue) as indicated in Figure 2. Images in **(A, B)** were obtained with a Leica DM2500/TCS SPE confocal microscope. Images in **(C)** were obtained with a Delta Vision system with an Olympus IX-71 microscope. Abbreviations: FL-ch, fetal liver chimera; IsoB4, isolectin B4; PLAP, placental alkaline phosphatase.

analysis in the livers from chimeras. We analyzed expression of CD45, a pan leukocyte marker, and isolectin B4 as a vascular endothelial marker. As shown in Figure 3A, the vast majority of PLAP⁺ cells in the patch coexpressed isolectin B4 (IsoB4) and only few were positive for CD45, indicating the endothelial nature of most PLAP⁺ cells (Fig. 3A). Analyzing CD31 in liver sections further confirmed the endothelial nature of PLAP⁺ cells in the patches, although expression of CD31 was weaker and not homogeneous (not shown). Colocalization of the myeloid marker F4/80 and CD45 by confocal Z-stack analysis indicated that some donor-derived cells within the PLAP⁺ patch were tissue-resident macrophages, intimately attached to the lumen of vascular sinusoids and presenting elongated shapes (supporting information Fig. 2). Scattered PLAP⁺ cells outside the PLAP⁺ vascular patch are mostly CD45⁺ (Fig. 3B). Costaining with anti-CD3 ϵ (T lymphocytes) and anti-F4/80 demonstrated that some of the scattered PLAP⁺ cells were lymphocytes and macrophages, respectively (Fig. 3C), in accordance with data showing that liver PLAP⁺ scattered cells in BM chimeras were IsoB4-CD45⁺ [46].

To test the possibility that chimeras also contained FL donor-derived hepatocytes we performed Y chromosome detection by FISH on female receptor mice presenting high-level male hematopoietic chimerism. We focused our analysis in liver areas presenting PLAP⁺ patches. Based on the probability of female/male ratio of donor FL cells, we reasoned that if a donor-derived patch integrated PLAP⁺ endothelial cells and PLAP⁻ donor-derived hepatocytes, at least 50% of the patches should contain male-derived Y⁺ signal. On sequential liver sections from FL chimeras we identified PLAP⁺ vascular patches and performed Y-FISH staining. Y⁺ signal was detected in approximately 85% of 4',6-diamidino-2-phenylindole-positive hepatocyte nuclei in control males (hepatocyte nuclei are big with prominent nucleoli, whereas endothelial nuclei are not apparent in the preparations) and no signal was detected in control females (supporting information Fig. 3). Of a total of 14 PLAP⁺ vascular patch-containing areas analyzed, each including 40-60 hepatocyte nuclei per patch, we scored 3 Y⁺ hepatocytes in two different PLAP⁺ vascular patches (supporting information Fig. 3), showing the contribution potential of FL-derived cells to hepatocytes in our

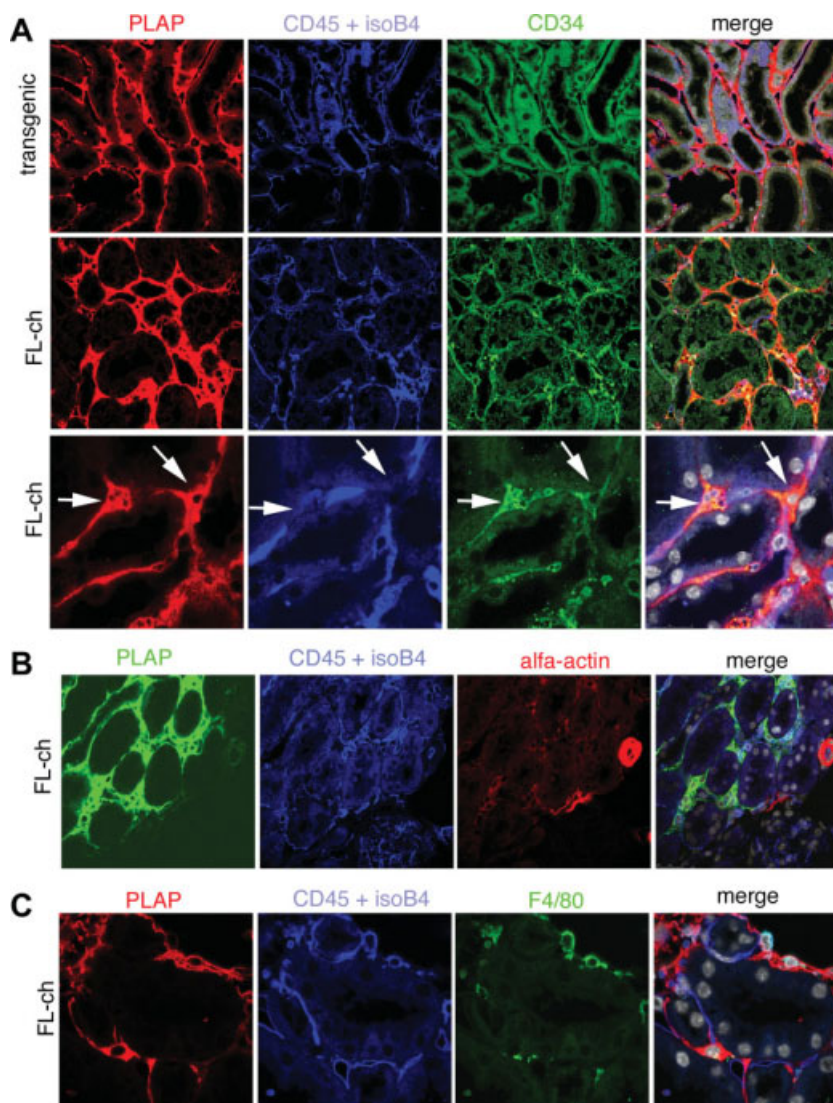


Figure 5. PLAP⁺CD45⁺IsoB4⁺ cells forming vascular-like patches in kidney express high levels of the hematovascular progenitor antigen CD34. (A): Confocal immunofluorescence images of kidney sections from SCL3' enhancer (Enh)-PLAP transgenic (upper panel) and SCL3'Enh-PLAP FL-derived chimeric (middle and lower panel) mice were costained with anti-PLAP (red) and anti-CD34 (green) followed by incubation with secondary antibodies. After extensive wash in phosphate-buffered saline, biotin-conjugated anti-CD45 and biotin-conjugated IsoB4 (blue) were added and incubated overnight followed by incubation with streptavidin-cyanin 5. Slides were mounted in medium containing 4',6-diamidino-2-phenylindole (light/dark gray nuclei). CD34 is expressed weakly in PLAP⁺ endothelium of microvasculature surrounding the kidney tubules in transgenic mice (upper panel). Stronger CD34 expression is observed in PLAP⁺ patches from kidneys derived from SCL3'Enh-PLAP FL chimeric mice (middle panel). Close-up images showed that most PLAP⁺CD45⁺IsoB4⁺ express CD34 antigen (arrows, lower panel). (B): Costaining with anti-PLAP (green), anti-smooth muscle α -actin (red), and biotin conjugated anti-CD45 plus biotin-conjugated IsoB4 (blue); and (C) costaining with anti-PLAP (red), anti-F4/80 (green), and biotin-conjugated anti-CD45 plus IsoB4 (blue) showed that most of the PLAP⁺ cells do not express high levels of α -actin smooth muscle antigen or F4/80 myeloid-associated antigen. Images were obtained with a Leica DM2500/TCS SPE confocal microscope. Abbreviations: FL-ch, fetal liver chimera; IsoB4, isolectin B4; PLAP, placental alkaline phosphatase.

transplantation system. However, the data suggest that there is no correlation in the appearance of donor-derived PLAP⁺ vascular patches and hepatocyte clusters. A large-scale analysis using multiple genetically marked FL donor cells with lineage tracers would be required to clearly establish whether the PLAP⁺ vascular patches extend beyond the endothelial cell lineage.

Fetal Liver-Derived Cells Form SCL3'Enh-PLAP⁺ Vascular-Like Structures in Kidney and Heart

To ascertain whether the formation of donor-derived vascular-like patches was present in other organs and not restricted to the liver, we analyzed expression of SCL+19-hPLAP by NBT staining on sections from kidneys and hearts from the long-term reconstituted FL chimeras (Table 1). Although all six chimeras presented PLAP⁺ patches in the kidney (supporting information Fig. 4A), we observed PLAP⁺ patches in only two of the six hearts analyzed, even after complete sectioning of two of the hearts (supporting information Fig. 4B). The heart patches were small and span few layers of cells. Also, PLAP⁺ scattered cells were abundant in the kidneys, but very rarely observed in the hearts. Importantly and in line with our analysis of liver sections, quantification of the signal from the scattered PLAP⁺ was consistently higher in the kid-

ney from FL chimeras compared with BM chimeras (NBT scattered signal of $3.18\% \pm 1.5\%$ vs. $1.5\% \pm 1\%$, respectively, $p < .04$). PLAP⁺ signal quantification in the heart was very low, even when performed in nonrandom selected sections presenting a PLAP⁺ spot (0.3% – 0.02% NBT⁺ signal). Therefore these data indicate that FL cells have the capacity to form PLAP⁺ vascular-like patches in all tissues analyzed (liver, kidney, and heart), whereas BM cells do not present this capacity. Furthermore, tissue-nested individual PLAP⁺ cells are overall more abundant in FL chimeras than BM chimeras independent of the tissues analyzed.

FL Donor-Derived Cells Expressing the SCL3'Enh-PLAP Reporter Construct in Vascular-Like Patches in the Kidney Are Mostly of Endothelial and Interstitial Appearance

Immunofluorescence and confocal image analysis for CD45 and IsoB4 showed that kidney sections from transgenic mice contain three types of PLAP⁺ cells, namely PLAP⁺CD45⁺IsoB4⁺ endothelial cells, PLAP⁺CD45⁺IsoB4⁺ hematopoietic cells, and PLAP⁺CD45⁺IsoB4⁺ interstitial cells (Fig. 4A) [46]. Similarly, three types of cell populations were identified in vascular-like patches derived from FL

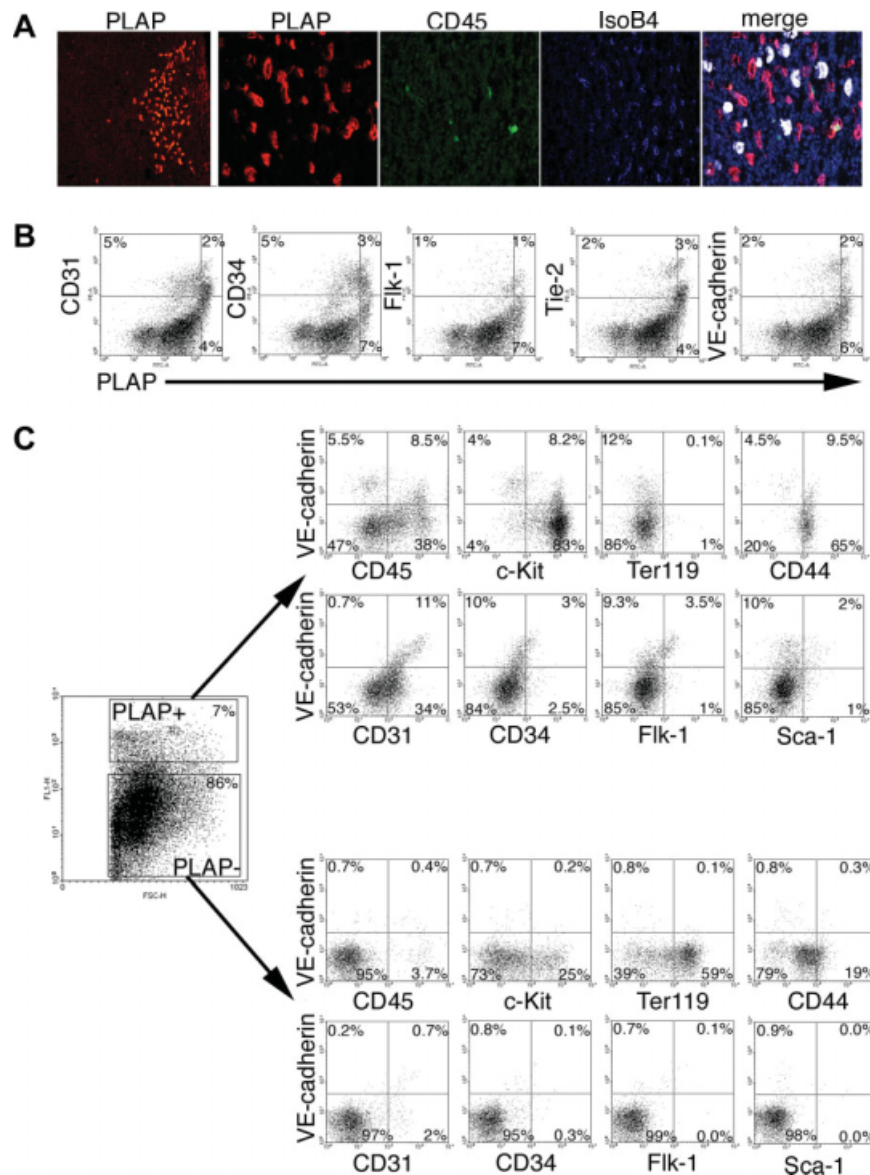


Figure 6. Sorted SCL3' enhancer (Enh)-PLAP⁺ fetal liver cells contribute to SCL3'Enh-PLAP⁺ vascular endothelial patches in transplantation experiments. **(A):** Confocal immunofluorescence images of liver sections from sorted fetal liver PLAP⁺-derived chimeric mice. Costaining with anti-PLAP (red), anti-CD45 (green), IsoB4 (blue), and 4',6-diamidino-2-phenylindole (gray) reveals PLAP⁺IsoB4⁺CD45⁻ vascular patches. Pictures taken at a magnification of $\times 200$ (left panel) and $\times 400$ on a Leica SPE confocal microscope. **(B):** Expression of endothelial markers on the fetal liver (FL)-PLAP⁺ population. Fluorescence-activated cell sorting analysis was performed on FL cells stained for PLAP (fluorescein isothiocyanate [FITC] channel) and the indicated markers (phycoerythrin [PE] channel). A substantial fraction of PLAP⁺ cells expressed the indicated endothelial-associated markers. Quadrants were established according to single-color staining and isotype controls. **(C):** Comparative phenotypic analysis of the fetal liver PLAP^{bright+} and PLAP⁻ population. Cell suspension from day 12 of gestation FL cells from transgenic and nontransgenic control fetuses was analyzed by multicolor flow cytometry. Triple staining shown was performed with nonconjugated PLAP, biotin-VE-cadherin (cad), and PE-conjugated specific antibodies followed by addition of streptavidin-cyanin 5 and Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit. Representative analysis/sorting windows for PLAP^{bright+} and PLAP⁻ are shown in a forward scatter/FITC dot plot representation. Percentage values refer to the gated populations. Within the PLAP^{bright+} population there is an increment on the frequency of hematopoietic progenitors (VE-cad⁺CD45⁺; VE-cad⁺c-Kit⁺) and endothelial/progenitor (VE-cad⁺CD31⁺, VE-cad⁺CD34⁺, VE-cad⁺Flk1⁺, and VE-cad⁺Sca-1⁺). Data are from one representative experiment. For each marker, 3-6 independent experiments were performed. Quadrants are based on wild-type and secondary antibody staining. Abbreviations: IsoB4, isolectin B4; PLAP, placental alkaline phosphatase; VE, vascular endothelial.

transplanted cells. We further confirmed the endothelial nature of IsoB4⁺ cells by staining with CD31 and performing confocal Z-stack analysis. As shown in Figure 4B, PLAP is expressed in the cytoplasm of the cells surrounding the lumen of the capillary, whereas CD31 is expressed mostly in the cell surface. Z-stack analysis shows that coexpression is maintained in the different planes that contained the nucleus, indicating coexpression of both markers in the same cell.

Heart sections from chimeras demonstrate that most PLAP⁺ cells express IsoB4 and are endothelial, similarly to the PLAP⁺ cells that form vascular patches in the liver (Fig. 4C).

These data prove that the cellular composition of the PLAP⁺ vascular-like patches varies depending on the targeted organ. Whereas the liver environment promotes differentiation and expansion of FL-derived PLAP⁺CD45⁻IsoB4⁺

endothelial cells, the kidney provides signals for expansion and maintenance of both PLAP⁺CD45⁻IsoB4⁻ progenitors and PLAP⁺CD45⁻IsoB4⁺ endothelial cells.

Phenotypic Characterization of PLAP⁺CD45⁻IsoB4⁻ Cells in the Kidney of FL-Derived Chimeras

We have previously suggested that intrarenal BM-derived SCL3'Enh⁺ cells could represent CD34⁺ hemangioblastic or angioblastic progenitors that amplify in response to ischemic damage [46]. To further phenotypically characterize FL-derived PLAP⁺CD45⁻IsoB4⁻ we stained kidney sections to detect CD34, a marker present in fetal liver stem cells [17], endothelial progenitors [64], and mature endothelial cells, although at lower levels [65]. Whereas low levels of CD34 expression are mostly associated with PLAP⁺CD45⁻IsoB4⁺ endothelial cells in the transgenic mouse (Fig. 5A upper panel), a higher signal is observed in the interstitial cells in the vascular-like patches present in FL chimeras (Fig. 5A, middle panel). High magnification images distinctively show PLAP⁺CD45⁻IsoB4⁻ cells expressing high levels of CD34, suggestive of their hemangioblastic or angioblastic nature (Fig. 5A, lower panel). We further assessed whether some PLAP⁺ interstitial cells could be related to muscular or myeloid progenitor cells also reported to express SCL3'Enh construct [49, 57]. Staining of kidney sections for α -actin, PLAP, CD45, and IsoB4 showed no coexpression of PLAP⁺ and α -actin in the chimeras (Fig. 5B), excluding a smooth muscle lineage. We also analyzed expression of the myeloid-associated marker F4/80, which was expressed in a minority of PLAP⁺CD45/IsoB4⁺ cells in the kidney from FL chimeras. No expression was observed in PLAP⁺CD45/IsoB4⁻ cells (Fig. 5C). These data are therefore consistent with a progenitor nature of the PLAP⁺IsoB4⁻CD45⁻ cells present in the kidney. Further functional characterization of this population should clarify their nature and interaction properties with hematovascular niches present in the kidney.

Sorted SCL3'Enh-PLAP^{bright+} Fetal Liver Cells Contribute to SCL3'Enh-PLAP⁺ Vascular Endothelial Patches in Transplantation Experiments

A great proportion of FL cells expressing the SCL3'Enh vector also coexpressed c-kit and CD34 progenitor markers and included most HSC activity [44]. To demonstrate whether SCL3'Enh-PLAP^{bright+} FL cells have the potential to generate vascular-endothelial patches we FACS sorted and transplanted PLAP^{bright+} cells to newborn recipient mice. To avoid excluding any cell populations with vascular activity we also transplanted PLAP⁻ cells. Of the 21 animals that received a transplant of PLAP^{bright+} cells, 10 presented with long-term hematopoietic chimerism. Mice with high hematopoietic engraftment were further analyzed to monitor the presence of SCL3'Enh-PLAP⁺ cells in liver sections. All animals presented NBT⁺ vascular-like patches. Confocal analysis showed that PLAP⁺ cells within the patch coexpress IsoB4 and most were negative for CD45, indicating their endothelial nature (Fig. 6A). None of the 38 animals that received a transplant of PLAP⁻ cells presented hematopoietic chimerism in peripheral blood. Nine animals were further analyzed for chimerism in hematopoietic organs (BM, spleen, thymus, and lymph nodes) by PCR-PLAP and chimerism on liver sections by NBT staining, showing no long-term hematopoietic or endothelial engraftment. Thus, the data prove that only FL PLAP^{bright+} donor cells can generate PLAP⁺ vascular patches upon transplantation. The data also indicate that vascular

patch formation was seen concurrently only with long-term hematopoietic engraftment.

FACS analysis further confirmed the presence of endothelial-associated markers (CD31, CD34, Flk-1, Tie-2, and vascular endothelial cadherin [VE-cad]) in the PLAP^{bright+} cells (Fig. 6B). Several of these markers are also expressed in HSCs. In particular, embryonic expression of VE-cad in combination with CD45 and different hematovascular markers distinguishes a population with in vitro endothelial differentiation capacity (VE-cad⁺CD45⁻) from HSCs (VE-cad⁺CD45⁺), unable to generate large numbers of endothelial cells in vitro [25]. To further address the characterization of PLAP^{bright+} hematovascular progenitor cells we performed a triple-color FACS analysis. PLAP^{bright+} cells presented a higher frequency of VE-cad^{bright+} cells negative for hematopoietic-associated (CD45, c-Kit, Ter119) and mesenchymal-associated (CD44) markers. VE-cad^{bright+} cells expressed the endothelial-associated (CD31, CD34, and Flk-1) molecules, representing more mature endothelial cells [25]. PLAP^{bright+}VE-cad^{bright+} cells are also positive for Sca-1, a marker associated with high proliferative FL endothelial progenitors [26]. Interestingly, VE-Cad^{bright+} Sca-1⁺ cells are not detected in the PLAP⁻ cell fraction (Fig. 6C). Further sorting and transplantation experiments will be required to determine the population or population combination responsible for the high in vivo vascular activity and the cells' relation to HSCs.

DISCUSSION

Different fetal liver cell populations present higher engraftment potential than their adult counterpart when transplanted. This has been demonstrated in hematopoietic [38, 39] and liver parenchyma [68] cell regeneration. Although mechanisms are not well understood [42, 69], there is a group of functional and phenotypic features of FL-derived hematopoietic cells that could be relevant to the enhanced engraftment capacity. HSCs and myeloid progenitors are of particular interest with regard to their direct potential to differentiate into endothelial cells [1, 2]. In contrast to the largely quiescent BM HSCs, FL-derived HSCs are proliferative cells commonly engaged in symmetrical self-renewing divisions [70] that may play a role in the generation of progeny with endothelial potential. Indeed, it was described that FL-HSCs give rise to myeloid lineage-skewed grafts upon transplantation [42] that can potentially be recruited to the vascular endothelium. Myeloid cells can contribute to endothelium by differentiation [2] or as accessory proangiogenic vascular cells [6]. As we do not detect F4/80⁺ myeloid cells in the majority of PLAP⁺ liver or kidney vascular patches we speculate that FL-derived myeloid progenitors may be involved in endothelial differentiation.

Another characteristic of FL-HSCs is the expression of receptors not present in adult BM-HSCs. For instance, FL-HSC express Mac-1 [17, 36], a β 2 integrin involved in leukocyte-endothelial and leukocyte-extracellular matrix interaction during homing of endothelial progenitors [71] and inflammation [72]. Further sorting and transplantation experiments of FL cells coexpressing the SCL3'Enh and Mac1 could help determine whether there is a correlation of enhanced long-term appearance of vascular endothelial patches, PLAP⁺ scattered signal, and the FL-derived SCL3'Enh-PLAP⁺Mac1⁺ population.

Alternatively, the extensive vascular potential could be related to properties of FL-derived endothelial cells. The observation that vascular patches are detected from 4 months after transplantation but not at earlier times indicates that

endothelial cells need some time to expand. Supporting this view are the data demonstrating that human fetal endothelial progenitor cells (EPCs) derived from the cord blood displayed in vitro higher proliferative potential and stronger response to angiogenic factors than the bone marrow-derived counterpart [73]. Also, in vitro-obtained FL-EPCs from E15–E21 fetuses presented high angiogenic efficiency in matrigel plugs compared with BM-derived EPCs [26]. Interestingly, in a different model, it has been shown that FL-derived hepatocytes generated in long-term transplantation assays could form extensive cell patches, not only due to their increased proliferative potential but also to the ability to induce apoptosis in the surrounding recipient-derived hepatocytes [74], a combination of features referred to as cell competition properties, which would define fetal cell as high competitors for tissue regeneration. Therefore it remains to be clarified whether the presence of FL-derived vascular-endothelial patches might also be the result of extensive proliferative potential and capability of inducing apoptosis on neighboring cells.

Another characteristic of FL vascular contribution is the variability in the extent and the cell type contribution depending on the targeted organ, limited to a few endothelial cells in the heart and extensive endothelial engraftment in the liver and kidney. Interestingly, the kidney presented not only endothelial cells but also a substantial fraction of interstitial cells negative for hematopoietic and endothelial markers. We have previously suggested that the presence of resident SCL3'Enh⁺ cells in the kidney that lack hematovascular-associated markers may signify local angioblastic/hemangioblastic progenitors. Using BM transplantation assays we demonstrated that this population could be derived from the BM. Since this population was not detectable in peripheral blood or liver vasculature, we concluded that it was specifically associated with the kidney [46]. Importantly, we now demonstrated that FL-derived progenitors are also capable of giving rise to SCL3'Enh⁺CD45⁺IsoB4⁺ cells in the kidney. Closer examination of this cell type has revealed lack of expression of smooth muscle- and myeloid-associated markers, but high CD34 expression, consistent with a progenitor of hematovascular nature. Concomitant to the increase of FL-derived endothelial cells, we also observed higher numbers of these putative progenitor cells.

Currently we cannot determine whether these donor-derived PLAP⁺ populations expand or differentiate from a single or multiple types of progenitor populations such as the HSCs, angioblasts, or mesenchymal stem cells. However, the fact that these different populations are always found together in the patches (i.e., there are no kidney patches formed by either endothelial or interstitial cells) suggests a common origin. Indeed, recent studies suggest that BM is probably not the exclusive source of adult blood-borne stem cells and in particular HSCs could migrate to defined microenvironments within "receptive" niches [75]. HSCs have been recovered from extramedullary sites such as the liver [76], spleen [77], muscle [78], and kidney [79]. The emerging idea is that all hematopoietic stem and progenitor cells traffic from the bone marrow to multiple peripheral organs where they reside for some time to return to the bone marrow. More importantly HSC progenitor cells can proliferate and give rise to extramedullary

tissue-resident hematopoietic cells mostly of myeloid lineage, at least when transferred to the kidney capsule. Considering that FL-derived HSCs have extensive proliferative capacity and engraftment potential and originate in an anatomical area related to kidney formation (the AGM region), together with the fact that the kidney serves as a hematopoietic organ in development and evolution and is therefore likely to preserve the hematopoietic microenvironment [80], we favor the idea that PLAP⁺CD45⁺IsoB4⁺CD34⁺ cells represent resident hemangioblastic progenitor cells. If so, it remains to be determined whether these cells directly participate in recovery from tissue injury and have the potential to generate blood and vascular cells.

CONCLUSION

Our results demonstrate that transplanted fetal liver cells present an extensive and ubiquitous vascular endothelial differentiation capacity when transplanted either into newborn or adult mice. Also, as the vascular patches are readily observed using SCL3'Enh-PALP reporter gene expression, the system constitutes a powerful model to investigate molecular mechanisms of endothelial differentiation and proliferation in vivo. In the field of tissue engineering and regenerative medicine great expectations have been placed on the use of stem and progenitor cells. In vascular regeneration a major limitation at the present time is that long-term incorporation of bone marrow-derived cells into vascular endothelium is very low, ranging from 1%–5% at most [1, 4, 66, 67]. The data presented here demonstrate a superior vascular contribution potential of the SCL3'Enh-PLAP⁺ cell population derived from fetal liver.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank E. Roldan-Amaro and A.M. Castro for their assistance with preparation of sections and immunostaining; K. Garcia-Garcia for her assistance with flow cytometry and confocal microscopy; S. Piltz, I. Prados, I. Rollan, and R. Morales for their support with the animal husbandry; and C. Luque for expert advice on microscope image analysis. This work was supported by the Spanish Ministry of Education and Science Grant SAF64679, Junta de Andalucía Grants PAI-BIO-295 and PAIDI-CTS1614, CONSOLIDER INGENIO 2010 Grant, the Leukemia Research Fund, fellowship CONACYT-179065 to A.M.G.-O., fellowship I3P-CSIC to C.Q., and fellowship UPO to A.C. A.M.G.-O. and A.C. contributed equally to this work.

DISCLOSURE OF POTENTIAL CONFLICTS OF INTEREST

The authors indicate no potential conflicts of interest.

REFERENCES

- 1 Bailey AS, Jiang S, Afentoulis M et al. Transplanted adult hematopoietic stem cells differentiate into functional endothelial cells. *Blood* 2004;103:13–19.
- 2 Bailey AS, Willenbring H, Jiang S et al. Myeloid lineage progenitors give rise to vascular endothelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103:13156–13161.
- 3 Jackson KA, Majka SM, Wang H et al. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest* 2001;107:1395–1402.

- 4 Grant MB, May WS, Caballero S et al. Adult hematopoietic stem cells provide functional hemangioblast activity during retinal neovascularization. *Nat Med* 2002;8:607–612.
- 5 Guthrie SM, Curtis LM, Mames RN, Simon GG, Grant MB, Scott EW. The nitric oxide pathway modulates hemangioblast activity of adult hematopoietic stem cells. *Blood* 2005;105:1916–1922.
- 6 Grunewald M, Avraham I, Dor Y et al. VEGF-induced adult neovascularization: recruitment, retention, and role of accessory cells. *Cell* 2006;124:175–189.
- 7 De Palma M, Venneri MA, Galli R et al. Tie2 identifies a hematopoietic lineage of proangiogenic monocytes required for tumor vessel formation and a mesenchymal population of pericyte progenitors. *Cancer Cell* 2005;8:211–226.
- 8 Duffield JS, Park KM, Hsiao LL et al. Restoration of tubular epithelial cells during repair of the postischemic kidney occurs independently of bone marrow-derived stem cells. *J Clin Invest* 2005;115:1743–1755.
- 9 Peters BA, Diaz LA, Polyak K et al. Contribution of bone marrow-derived endothelial cells to human tumor vasculature. *Nat Med* 2005;11:261–262.
- 10 Rajantie I, Ilmonen M, Almaine A et al. Adult bone marrow-derived cells recruited during angiogenesis comprise precursors for periendothelial vascular mural cells. *Blood* 2004;104:2084–2086.
- 11 Ziegelhoeffer T, Fernandez B, Kostin S et al. Bone marrow-derived cells do not incorporate into the adult growing vasculature. *Circ Res* 2004;94:230–238.
- 12 Dekel B, Shezen E, Even-Tov-Friedman S et al. Transplantation of human hematopoietic stem cells into ischemic and growing kidneys suggests a role in vasculogenesis but not tubulogenesis. *Stem Cells* 2006;24:1185–1193.
- 13 Garcia-Barros M, Paris F, Cordon-Cardo C et al. Tumor response to radiotherapy regulated by endothelial cell apoptosis. *Science* 2003;300:1155–1159.
- 14 Schatteman GC, Dunnwald M, Jiao C. Biology of bone marrow-derived endothelial cell precursors. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007;292:H1–H18.
- 15 Göthert JR, Gustin SE, van Eekelen JA et al. Genetically tagging endothelial cells in vivo: bone marrow-derived cells do not contribute to tumor endothelium. *Blood* 2004;104:1769–1777.
- 16 Müller AM, Medvinsky A, Strouboulis J et al. Development of hematopoietic stem cell activity in the mouse embryo. *Immunity* 1994;1:291–301.
- 17 Sánchez MJ, Holmes A, Miles C et al. Characterization of the first definitive hematopoietic stem cells in the AGM and liver of the mouse embryo. *Immunity* 1996;5:513–525.
- 18 Medvinsky A, Dzierzak E. Definitive hematopoiesis is autonomously initiated by the AGM region. *Cell* 1996;86:897–906.
- 19 de Bruijn MF, Ma X, Robin C et al. Hematopoietic stem cells localize to the endothelial cell layer in the midgestation mouse aorta. *Immunity* 2002;16:673–683.
- 20 Ottersbach K, Dzierzak E. The murine placenta contains hematopoietic stem cells within the vascular labyrinth region. *Dev Cell* 2005;8:377–387.
- 21 Fehling HJ, Lacaud G, Kubo A et al. Tracking mesoderm induction and its specification to the hemangioblast during embryonic stem cell differentiation. *Development* 2003;130:4217–4227.
- 22 Vogeli KM, Jin SW, Martin GR et al. A common progenitor for haematopoietic and endothelial lineages in the zebrafish gastrula. *Nature* 2006;443:337–339.
- 23 Huber TL, Kouskoff V, Fehling HJ et al. Haemangioblast commitment is initiated in the primitive streak of the mouse embryo. *Nature* 2004;432:625–630.
- 24 Nishikawa SI, Nishikawa S, Kawamoto H et al. In vitro generation of lymphohematopoietic cells from endothelial cells purified from murine embryos. *Immunity* 1998;8:761–769.
- 25 Taoudi S, Morrison AM, Inoue H et al. Progressive divergence of definitive haematopoietic stem cells from the endothelial compartment does not depend on contact with the foetal liver. *Development* 2005;132:4179–4191.
- 26 Cherqui S, Kurian SM, Schussler O et al. Isolation and angiogenesis by endothelial progenitors in the fetal liver. *Stem Cells* 2006;24:44–54.
- 27 Yao H, Liu B, Wang X et al. Identification of high proliferative potential precursors with hemangioblastic activity in the mouse aorta-gonad-mesonephros region. *Stem Cells* 2007;25:1423–1430.
- 28 Yoder MC, Mead LE, Prater D et al. Redefining endothelial progenitor cells via clonal analysis and hematopoietic stem/progenitor cell principals. *Blood* 2007;109:1801–1809.
- 29 Chen MJ, Yokomizo T, Zeigler BM et al. Runx1 is required for the endothelial to haematopoietic cell transition but not thereafter. *Nature* 2009;457:887–891.
- 30 Lancrin C, Sroczynska P, Stephenson C et al. The haemangioblast generates haematopoietic cells through a haemogenic endothelium stage. *Nature* 2009;457:892–895.
- 31 Eilken HM, Nishikawa S, Schroeder T. Continuous single-cell imaging of blood generation from haemogenic endothelium. *Nature* 2009;457:896–900.
- 32 Dzierzak E. Hematopoietic stem cells and their precursors: developmental diversity and lineage relationships. *Immunol Rev* 2002;187:126–138.
- 33 Ikuta K, Kina T, MacNeil I et al. A developmental switch in thymic lymphocyte maturation potential occurs at the level of hematopoietic stem cells. *Cell* 1990;62:863–874.
- 34 Hardy RR, Hayakawa K. A developmental switch in B lymphopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:11550–11554.
- 35 Ivanova NB, Dimos JT, Schaniel C et al. A stem cell molecular signature. *Science* 2002;298:601–604.
- 36 Morrison SJ, Hemmati HD, Wandycz AM et al. The purification and characterization of fetal liver hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:10302–10306.
- 37 Pina C, Enver T. Differential contributions of haematopoietic stem cells to foetal and adult haematopoiesis: insights from functional analysis of transcriptional regulators. *Oncogene* 2007;26:6750–6765.
- 38 Rebel VI, Miller CL, Thornbury GR et al. A comparison of long-term repopulating hematopoietic stem cells in fetal liver and adult bone marrow from the mouse. *Exp Hematol* 1996;24:638–648.
- 39 Harrison DE, Zhong RK, Jordan CT et al. Relative to adult marrow, fetal liver repopulates nearly five times more effectively long-term than short-term. *Exp Hematol* 1997;25:293–297.
- 40 Szilvassy SJ, Meyerrose TE, Ragland PL et al. Differential homing and engraftment properties of hematopoietic progenitor cells from murine bone marrow, mobilized peripheral blood, and fetal liver. *Blood* 2001;98:2108–2115.
- 41 Kikuchi K, Kondo M. Developmental switch of mouse hematopoietic stem cells from fetal to adult type occurs in bone marrow after birth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:17852–17857.
- 42 Bowie MB, Kent DG, Dykstra B et al. Identification of a new intrinsically timed developmental checkpoint that reprograms key hematopoietic stem cell properties. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:5878–5882.
- 43 Bowie MB, Kent DG, Copley MR et al. Steel factor responsiveness regulates the high self-renewal phenotype of fetal hematopoietic stem cells. *Blood* 2007;109:5043–5048.
- 44 Silberstein L, Sánchez MJ, Socolovsky M et al. Transgenic analysis of the SCL +19 stem cell enhancer in adult and embryonic haematopoietic and endothelial cells. *Stem Cells* 2005;23:1378–1388.
- 45 Sánchez MJ, Bockamp EO, Miller J et al. Selective rescue of early haematopoietic progenitors in Scl(-/-) mice by expressing Scl under the control of a stem cell enhancer. *Development* 2001;128:4815–4827.
- 46 Dekel B, Metsuayan S, Garcia AM et al. Organ-injury-induced reactivation of hemangioblastic precursor cells. *Leukemia* 2008;22:103–113.
- 47 Yoder MC, Cumming JG, Hiatt K et al. A novel method of myeloablation to enhance engraftment of adult bone marrow cells in newborn mice. *Biol Blood Marrow Transplant* 1996;2:59–67.
- 48 Sands MS, Barker JE. Percutaneous intravenous injection in neonatal mice. *Lab Anim Sci* 1999;49:328–330.
- 49 Sánchez M, Gottgens B, Sinclair AM et al. An SCL 3' enhancer targets developing endothelium together with embryonic and adult haematopoietic progenitors. *Development* 1999;126:3891–3904.
- 50 Müller AM, Dzierzak EA. ES cells have only a limited lymphopoietic potential after adoptive transfer into mouse recipients. *Development* 1993;118:1343–1351.
- 51 Hicks DJ, Johnson L, Mitchell SM et al. Evaluation of zinc salt based fixatives for preserving antigenic determinants for immunohistochemical demonstration of murine immune system cell markers. *Biotech Histochem* 2006;81:23–30.
- 52 Gerhardt H, Golding M, Fruttiger M et al. VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *J Cell Biol* 2003;161:1163–1177.
- 53 Toth ZE, Shahar T, Leker R et al. Sensitive detection of GFP utilizing tyramide signal amplification to overcome gene silencing. *Exp Cell Res* 2007;313:1943–1950.
- 54 Young PP, Hoffing AA, Sands MS. VEGF increases engraftment of bone marrow-derived endothelial progenitor cells (EPCs) into vasculature of newborn murine recipients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:11951–11956.
- 55 Yoder MC, Hiatt K, Mukherjee P. In vivo repopulating hematopoietic stem cells are present in the murine yolk sac at day 9.0 postcoitus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:6776–6780.
- 56 Gottgens B, Nastos A, Kingston S et al. Establishing the transcriptional programme for blood: the SCL stem cell enhancer is regulated by a multiprotein complex containing Ets and GATA factors. *EMBO J* 2002;21:3039–3050.
- 57 Pimanda JE, Silberstein L, Dominici M et al. Transcriptional link between blood and bone: the stem cell leukemia gene and its +19

- stem cell enhancer are active in bone cells. *Mol Cell Biol* 2006;26:2615–2625.
- 58 Zhang F, Hackett NR, Lam G et al. Green fluorescent protein selectively induces HSP70-mediated up-regulation of COX-2 expression in endothelial cells. *Blood* 2003;102:2115–2121.
 - 59 Wagers AJ, Weissman IL. Differential expression of alpha2 integrin separates long-term and short-term reconstituting Lin-/loThy1.1(lo)c-kit+ Sca-1+ hematopoietic stem cells. *Stem Cells* 2006;24:1087–1094.
 - 60 Zijlmans JM, Visser JW, Laterveer L et al. The early phase of engraftment after murine blood cell transplantation is mediated by hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:725–729.
 - 61 Taylor PA, McElmurry RT, Lees CJ, Harrison DE, Blazar BR. Allogenic fetal liver cells have a distinct competitive engraftment advantage over adult bone marrow cells when infused into fetal as compared with adult severe combined immunodeficient recipients. *Blood* 2002;99:1870–1872.
 - 62 MacLaren RE, Pearson RA, MacNeil A et al. Retinal repair by transplantation of photoreceptor precursors. *Nature* 2006;444:203–207.
 - 63 Yong KL, Fahey A, Pahal G et al. Fetal haemopoietic cells display enhanced migration across endothelium. *Br J Haematol* 2002;116:392–400.
 - 64 Asahara T, Murohara T, Sullivan A et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997;275:964–967.
 - 65 Lin G, Finger E, Gutierrez-Ramos JC. Expression of CD34 in endothelial cells, hematopoietic progenitors and nervous cells in fetal and adult mouse tissues. *Eur J Immunol* 1995;25:1508–1516.
 - 66 Balsam LB, Wagers AJ, Christensen JL et al. Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium. *Nature* 2004;428:668–673.
 - 67 Larrivee B, Niessen K, Pollet I et al. Minimal contribution of marrow-derived endothelial precursors to tumor vasculature. *J Immunol* 2005;175:2890–2899.
 - 68 Dabeva MD, Petkov PM, Sandhu J et al. Proliferation and differentiation of fetal liver epithelial progenitor cells after transplantation into adult rat liver. *Am J Pathol* 2000;156:2017–2031.
 - 69 Kim I, Saunders TL, Morrison SJ. Sox17 dependence distinguishes the transcriptional regulation of fetal from adult hematopoietic stem cells. *Cell* 2007;130:470–483.
 - 70 Bowie MB, McKnight KD, Kent DG et al. Hematopoietic stem cells proliferate until after birth and show a reversible phase-specific engraftment defect. *J Clin Invest* 2006;116:2808–2816.
 - 71 Chavakis E, Aicher A, Heeschen C et al. Role of beta2-integrins for homing and neovascularization capacity of endothelial progenitor cells. *J Exp Med* 2005;201:63–72.
 - 72 Orlova VV, Choi EY, Xie C et al. A novel pathway of HMGB1-mediated inflammatory cell recruitment that requires Mac-1-integrin. *EMBO J* 2007;26:1129–1139.
 - 73 Bompais H, Chagraoui J, Canron X et al. Human endothelial cells derived from circulating progenitors display specific functional properties compared with mature vessel wall endothelial cells. *Blood* 2004;103:2577–2584.
 - 74 Oertel M, Menthe A, Dabeva MD et al. Cell competition leads to a high level of normal liver reconstitution by transplanted fetal liver stem/progenitor cells. *Gastroenterology* 2006;130:507–520; quiz 590.
 - 75 Kaplan RN, Psaila B, Lyden D. Niche-to-niche migration of bone-marrow-derived cells. *Trends Mol Med* 2007;13:72–81.
 - 76 Cardier JE, Barbera-Guillem E. Extramedullary hematopoiesis in the adult mouse liver is associated with specific hepatic sinusoidal endothelial cells. *Hepatology* 1997;26:165–175.
 - 77 Wright DE, Wagers AJ, Gulati AP, Johnson FL, Weissman IL. Physiological migration of hematopoietic stem and progenitor cells. *Science* 2001;294:1933–1936.
 - 78 McKinney-Freeman SL, Jackson KA, Camargo FD, Ferrari G, Mavilio F, Goodell MA. Muscle-derived hematopoietic stem cells are hematopoietic in origin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:1341–1346.
 - 79 Massberg S, Schaerli P, Knezevic-Maramica I et al. Immunosurveillance by hematopoietic progenitor cells trafficking through blood, lymph, and peripheral tissues. *Cell* 2007;131:994–1008.
 - 80 Murayama E, Kissa K, Zapata A et al. Tracing hematopoietic precursor migration to successive hematopoietic organs during zebrafish development. *Immunity* 2006;25:963–975.



See www.StemCells.com for supporting information available online.